

PENGARUH GETAH BATANG PISANG AMBON (*Musa paradisiaca* var.*sapientum*) TERHADAP MIGRASI SEL ENDOTEL PADA HUVECS (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) YANG DIPAPAR OLEH CADMIUM

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vii
Daftar Isi	ix
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Singkatan	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Inflamasi.....	5
2.2 Luka	6
2.2.1 Definisi Luka	7
2.2.2 Proses Penyembuhan Luka.....	7
2.3 Pembuluh Darah	12
2.4 Sel Endotel.....	13
2.4.1 Definisi Sel Endotel.....	13
2.4.2 Pembentukan Sel Endotel	14
2.4.3 Migrasi Sel Endotel.....	15
2.4.4 Kemotaksis Sel Endotel	15
2.4.5 Disfungsi Sel Endotel.....	16
2.4.6 Kultur Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)	16
2.5 Cadmium.....	16

2.5.1 Struktur Kimia dan Gambaran Umum	17
2.5.2 Metabolisme Cadmium	17
2.5.3 Toksisitas Cadmium	18
2.6 Pisang Ambon	19
2.6.1 Taxonomi Pisang Ambon	19
2.6.2 Distribusi Pisang Ambon	21
2.6.3 Morfologi Pisang Ambon	21
2.6.4 Kegunaan Tradisional	22
2.6.5 Kandungan Getah Batang Pisang Ambon	23
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep	24
3.2 Hipotesis Penelitian dan Roadmap Penelitian	25
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis Rancangan	26
4.2 Sampel	26
4.3 Kriteria Sampel Rancangan	26
4.4 Pengulangan (Replikasi)	27
4.5 Variabel Penelitian	27
4.5.1 Variabel Bebas	28
4.5.2 Variabel Kontrol	28
4.5.3 Variabel Terikat	28
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	28
4.7 Definisi Operasional	29
4.8 Bahan dan Alat penelitian	30
4.9 Prosedur Kerja	31
4.10 Penghitungan Migrasi Sel Endotel	36
BAB 5 ANALISA DATA DAN HASIL PENELITIAN	
5.1 Hasil Penelitian	38
5.2 Analisa Data	41
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian	46
6.2 Implikasi Penelitian	51
6.3 Keterbatasan Penelitian	51
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	52

7.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN.....	58



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH GETAH BATANG PISANG AMBON (*Musa paradisiaca*
var. sapientum) TERHADAP MIGRASI SEL ENDOTEL PADA HUVECS
(*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) YANG DIPAPAR OLEH CADMIUM**

Oleh:

Maria Juliana Dorothy

NIM: 155070101111048


Telah diuji pada

Hari : Senin

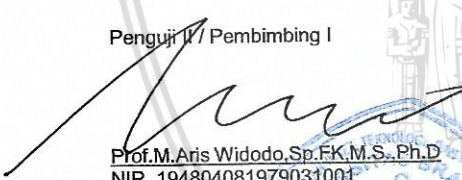
Tanggal : 3 Desember 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji 1


dr. Aina Angelina, Sp.PA
2012088509032001

Penguji II / Pembimbing I



Prof. M. Aris Widodo, Sp.FK M.S., Ph.D
NIP. 194804081979031001

Penguji III / Pembimbing II


Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.kes
NIP. 195210271981032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter


Dr. Triwahyu Astuti, M.Kes., Sp.P
NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Dorothy, Maria Juliana. 2018. ***Pengaruh Getah Batang Pisang Ambon (Musa paradisiaca var.sapientum) Terhadap Migrasi Sel Endotel pada HUVECS (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) yang Dipapar oleh Cadmium.*** Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Prof. M. Aris Widodo Sp.FK,M.S, Ph.D, (2) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes

Luka dapat disebabkan oleh beberapa faktor baik faktor suhu, kimia dan mekanik. Salah satu bahan kimia yang menyebabkan terjadinya luka pada tingkat seluler adalah logam berat. Penyebab utama mekanisme disfungsi endotel adalah secara langsung dan tidak langsung yang berhubungan dengan berkembangnya stress oksidatif. Logam berat yang dapat menyebabkan kerusakan endotel, contohnya adalah *cadmium*. *Cadmium* merupakan salah satu logam berat yang dapat mempengaruhi kesehatan. *Cadmium* banyak terdapat dimana-mana seperti udara, asap serta debu halus. *Cadmium* juga didapatkan dari lingkungan seperti pada produksi logam besi serta baja, pembakaran bahan bakar fosil dan insinerasi limbah. Salah satu tanaman yang pernah diteliti dan memiliki efektivitas dalam penyembuhan luka adalah tanaman pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*). Getah batang pisang Ambon memiliki banyak kandungan aktif yaitu flavonoid, saponin, dan tanin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*) terhadap migrasi sel endotel HUVECs yang dipapar oleh *cadmium* dengan menggunakan *post test only control group design*. Prosentase getah batang pisang Ambon yang digunakan adalah 0,125%,0,25%,dan 0,5% dengan masing-masing empat kali pengulangan dan diamati dalam 3 *time series* yaitu jam ke 12,24,48. Analisa statistik menggunakan uji ANOVA menunjukkan getah batang pisang Ambon signifikan berpengaruh pada jam ke 24 dan 48 pada prosentase dosis 0,5%. Dan pada pemberian *cadmium* tidak signifikan berbeda dengan kelompok yang tanpa pemberian *cadmium* pada semua kelompok dan *time series*. Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa getah batang pisang Ambon dapat meningkatkan migrasi sel endotel HUVECs yang dipapar oleh *cadmium*.

Kata Kunci: getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*), HUVECs, *cadmium*, migrasi sel endotel

ABSTRACT

Dorothy, Maria Juliana. 2018. **The Effect of Ambon banana stem sap (*Musa paradisiaca var.sapientum*) on the migration of HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) that exposed by cadmium.** Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Prof. M. Aris Widodo Sp.FK,M.S, Ph.D, (2) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes

Wounds can be caused by several factors both temperature, chemical and mechanical factors. One of the chemicals that causes injury at the cellular level is heavy metals. The main causes of the mechanism of endothelial dysfunction are directly and indirectly related to the development of oxidative stress. Heavy metals that can caused endothelial damage, for example cadmium. Cadmium is one of the heavy metals that can affect health. Many cadmiums can be found at air, smoke and fine dust. Cadmium is also obtained from the environment such as the production of iron and steel, burning fossil fuels and incinerating wastes. One of the plants that has been studied and has effectiveness in wound healing is Ambon banana stem sap (*Musa paradisiaca var.sapientum*). Ambon banana stem sap has many active ingredients, such as flavonoids, saponins, and tannin. The purpose of this study was to determine the effect of Ambon banana stem sap (*Musa paradisiaca var.sapientum*) on the migration of HUVECs that exposed by cadmium using post test only control group design. The percentage of Ambon banana stem sap used was 0.125%, 0.25%, and 0.5% with four repetitions each of it and was observed in 3 time series 12,24,48 hours. Statistical analysis using One-Way ANOVA Test showed that the banana sap had a significant effect on the 24 and 48 hours in dose 0,5%. And in control positive with cadmium is not different significant with group control negative without cadmium in all time series and group treatment. Based on this study, it can be concluded that Ambon banana stem sap can increase HUVEC endothelial cell migration exposed by cadmium.

Keywords: Ambon banana stem sap (*Musa paradisiaca var.sapientum*), HUVECs, cadmium, endothelial cell migration

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi adalah suatu reaksi kompleks akibat stimulus eksogen dan endogen pada jaringan ikat yang memiliki vaskularisasi dan merupakan respon protektif untuk menghilangkan penyebab terjadinya jejas serta membuang kerusakan sel berupa jaringan nekrotik dan sel yang rusak (Robbins, 2004)

Proses penyembuhan luka dibagi menjadi 4 fase yaitu koagulasi dan homeostasis, inflamasi, proliferasi dan remodelling (Velmar et al, 2009). Pada fase koagulasi terdapat keseimbangan dinamis antara sel endotel, trombosit, koagulasi dan fibrinolisis yang mengatur proses homeostasis. Bekuan darah serta platelet yang terperangkap penting untuk proses homeostasis agar terjadi migrasi sel. Molekul yang berada dalam sitoplasma seperti *alfa granule* yang berisi *growth factor* dan sitokin seperti *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* (TGF) dan *insulin like growth factor* (IGF) yang akan mengaktivasi dan menarik neutrofil, makrofag, sel endotel dan fibroblast sehingga terjadilah proses *wound healing* (Velmar et al, 2009). Faktor pertumbuhan yang berperan penting dalam proses angiogenesis adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang berperan sebagai mitogen sel endotel (Bao, 2009).

Luka dapat disebabkan oleh beberapa faktor baik faktor suhu, kimia dan mekanik. Salah satu bahan kimia yang menyebabkan terjadinya luka pada tingkat seluler adalah logam berat. Penyebab utama mekanisme disfungsi endotel adalah secara langsung dan tidak langsung yang berhubungan dengan berkembangnya stress oksidatif terutama dalam peningkatan produksi anion superoksida melalui

NADPH-oxidase dan *xanthine oxidase*. Yang menyebabkan berkurangnya bioavailabilitas vasodilator endotel yaitu NO (*Nitric Oxide*), dan sekaligus meningkatkan pembentukan anion superoksida. Sehingga fungsi vaskular endotel menjadi terganggu, bermanifestasi sebagai hilangnya vasorelaksasi endotel, meningkatkan trombosis, berkembangnya pro-inflamasi umum (peningkatan ekspresi molekul adhesi vaskular) dan peningkatan permeabilitas vaskular (Mudau, et.al., 2012).

Logam berat dapat menyebabkan kerusakan endotel, contohnya adalah *cadmium*. *Cadmium* merupakan salah satu logam berat yang dapat mempengaruhi kesehatan. Lamanya penyerapan *cadmium* ditransportasikan melalui darah ke berbagai organ di tubuh manusia dengan waktu paruh 15-20 tahun. (Kundu et al., 2009). *Cadmium* banyak terdapat dimana-mana seperti udara, asap serta debu halus. *Cadmium* juga didapatkan dari lingkungan seperti pada produksi logam besi serta baja, pembakaran bahan bakar fosil dan insinerasi limbah (Morrow, 2010).

Salah satu tanaman yang pernah diteliti dan memiliki efektivitas dalam penyembuhan luka adalah tanaman pisang Ambon (*Musa Paradisiaca var.sapientum*). Getah batang pisang Ambon memperlihatkan bahwa terjadi penyembuhan luka yang cepat saat diberikan ekstrak batang pisang Ambon pada luka sayatan yang dilakukan pada hewan coba mencit. Selain mempercepat proses penyembuhan luka, getah batang pisang ambon dapat mempercepat proses neokapilerisasi, mempengaruhi sel radang, mempercepat re-epitelisasi dan meningkatkan jaringan ikat pada kulit seta dapat menghilangkan bekas luka secara makroskopis (Bayu,2008).

Getah pisang Ambon mengandung kandungan bahan aktif seperti saponin, flavonoid, tanin serta asam askorbat. Saponin berfungsi meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru pada luka sehingga suplai oksigen dan nutrisi lebih banyak. Flavonoid berfungsi untuk memperpendek waktu peradangan yang dapat menghambat penyembuhan. Tanin juga dapat memicu penyembuhan luka dengan mekanisme seluler yaitu membuang radikal bebas dan memicu pertumbuhan fibroblast serta pembuluh darah (Lai et al., 2011). Asam askorbat berfungsi untuk memperkuat dan mempercepat pertumbuhan jaringan baru (Yosaphat, 2012). Sehingga getah batang pisang Ambon tersebut dapat

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efektivitas kandungan getah pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) dalam mempercepat proses penyembuhan luka dengan melihat migrasi sel endotel yang menggunakan kultur sel HUVECs yang diinflamasi dengan *scratch* dan dipapar logam berat *cadmium*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah getah batang pisang Ambon berpengaruh pada peningkatan migrasi sel HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang telah di *scratch* dan diperparah logam berat *cadmium*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa getah batang pisang Ambon (*Musa Paradisiaca* var. *Sapientum*) dapat meningkatkan migrasi sel endotel pada kultur HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang di *scratch* dan dipapar oleh logam berat *cadmium*

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui pengaruh konsentrasi getah batang pisang Ambon terhadap jarak migrasi sel endotel pada kultur HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang di *scratch* dan diinduksi logam berat *cadmium*

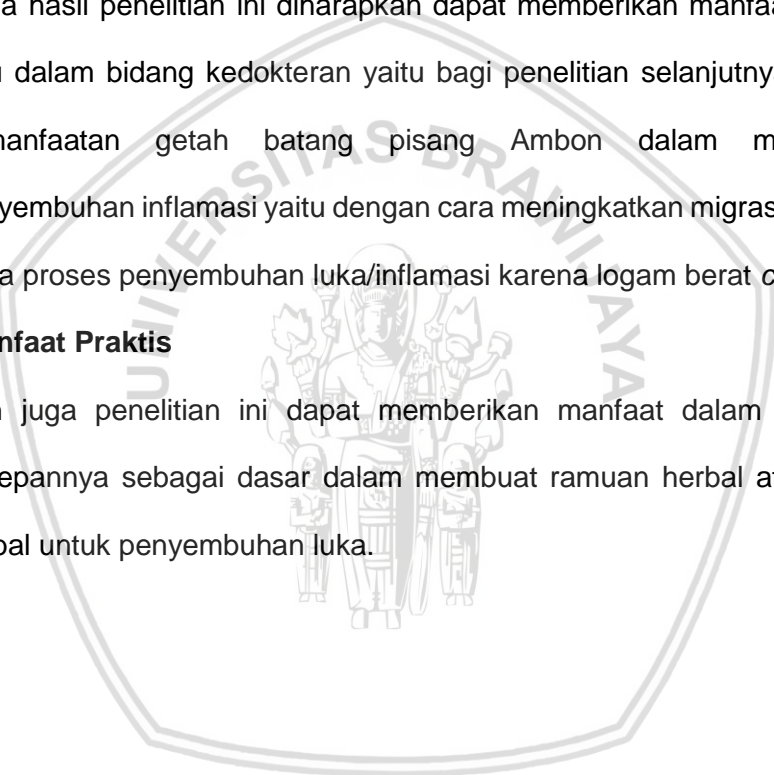
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Pada hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kontribusi ilmu dalam bidang kedokteran yaitu bagi penelitian selanjutnya dalam hal pemanfaatan getah batang pisang Ambon dalam mempercepat penyembuhan inflamasi yaitu dengan cara meningkatkan migrasi sel endotel pada proses penyembuhan luka/inflamasi karena logam berat *cadmium*.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dan juga penelitian ini dapat memberikan manfaat dalam masyarakat kedepannya sebagai dasar dalam membuat ramuan herbal ataupun obat herbal untuk penyembuhan luka.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 INFLAMASI

Inflamasi adalah respon biologis kompleks dari jaringan vaskuler atas adanya bahaya, seperti patogen, merusakkan sel, atau iritasi. Hal tersebut merupakan perlindungan diri tubuh kita untuk menghilangkan rangsangan penyebab luka dan inisiasi proses penyembuhan jaringan. Jika inflamasi tidak ada, maka luka dan infeksi tidak akan sembuh dan akan mengalami kerusakan yang lebih parah. Inflamasi dapat dibedakan atas inflamasi akut dan kronis. Inflamasi akut adalah respon awal tubuh oleh benda berbahaya dan terus meningkat sejalan dengan meningkatnya pergerakan plasma dan leukosit dari darah ke jaringan luka. Reaksi biokimia berantai yang mempropagasi dan pematangan respon imun, termasuk sistem vaskuler, sistem imun dan berbagai sel yang ada pada jaringan luka. Inflamasi kronis merupakan inflamasi yang berkepanjangan, memicu peningkatan pergantian tipe sel yang ada pada tempat inflamasi dan dicirikan dengan kerusakan dan penutupan jaringan berupa *scar* dari proses inflamasi.

Inflamasi merupakan respon jaringan terhadap rangsangan fisik atau kimiawi yang merusak sel tubuh. Rangsangan ini menyebabkan lepasnya mediator inflamasi seperti histamin, serotonin, bradikinin, dan prostaglandin, yang menimbulkan reaksi radang berupa panas, nyeri, merah, bengkak, dan disertai gangguan fungsi. Kerusakan sel yang terkait dengan inflamasi berpengaruh pada selaput membran sel yang menyebabkan leukosit mengeluarkan enzim-enzim lisosomal dan asam arakidonat., selanjutnya dilepaskan dari persenyawaan-

persenyawaan terdahulu. Jalur siklooksigenase (COX) dari metabolisme arakidonat menghasilkan prostaglandin yang mempunyai efek pada pembuluh darah, ujung saraf, dan pada sel-sel yang terlibat dalam inflamasi yang mengakibatkan nyeri. Sel- Sel Inflamasi merupakan sel radang, baik radang akut yang berupa *polymorfonuclear cell* (eosinofil, basofil, neutrofil) maupun radang kronis yang berupa *mononuclear cell* (limfosit dan monosit) yang terakumulasi pada daerah jejas/cedera yang terlihat pada sediaan histopatologi aorta tikus. Sel radang *polymorphonuclear* : sel yang tampak terdapat banyak granula pada sitoplasmanya dan macamnya ada tiga yaitu eosinofil berbentuk bulat, besar, granulanya bewarna merah tersebar rata intinya terdiri dua lobus, basophil berbentuk bulat paling besar, granul kebiruan menutup inti, intinya 2 lobus seperti huruf S/V besar dan terlihat kabur, sedangkan neutrophil berbentuk kecil, granul halus, bewarna merah pucat, intinya memanjang seperti tapal kuda untuk neutrophil non segmented dan terbentuk dari 2-5 lobus yang dihubungkan oleh filament untuk neutrophil segmented. Untuk sel radang *mononuclear* : sel yang tampak tidak mempunyai granula spesifik di sitoplasmanya. Sel limfosit sitoplasmanya bewarna biru muda, intinya relative besar dan gelap, sedangkan monosit sitoplasmanya biru keunguan, intinya berbentuk ovoid/seperti ginjal/berbentuk U dan umumnya terletak eksentris (Kumar, Vinay, K. Abul Abbas, & Aster Jon C., 2013).

2.2 LUKA

2.2.1 Definisi

Luka merupakan suatu keadaan kontinuitas dari suatu jaringan yang terputus karena cedera maupun pembedahan. Berdasarkan sifat ada luka terbuka, luka penetrasi, luka laserasi, luka insisi, luka abrasi, kontusio, dan lain-lain. Sedangkan pada struktur lapisan kulitnya dibagi menjadi superfisial (lapisan epidermis), *partial thickness* (meliputi epidermis dan dermis), dan *full thickness* (meliputi epidermis, dermis, lapisan lemak, fascia sampai tulang). (Kartika, 2015).

2.2.2 Proses Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka dibagi menjadi 3 yaitu penyembuhan primer (*healing by primary intention*) dimana bagian dari tepi luka bisa menyatu kembali, permukaan bersih, tidak ada jaringan yang hilang. Lalu penyembuhan sekunder (*healing by secondary intention*) Sebagian jaringan hilang, proses penyembuhan berlangsung mulai dari pembentukan jaringan granulasi di dasar luka dan sekitarnya. Dan *delayed primary healing (tertiary healing)* merupakan penyembuhan luka yang berlangsung lambat, sering disertai infeksi, diperlukan penutupan luka secara manual (Kartika, 2015).

Terdapat 4 fase penyembuhan luka yaitu:

1. Fase koagulasi dan haemostasis

Segera setelah kerusakan atau injury, fase koagulasi dan haemostasis pertama kali muncul dalam luka. Prinsip mekanisme ini yaitu untuk mencegah perdarahan (*exanguination*). Hal tersebut merupakan cara untuk melindungi sistem vaskular, menjaga tetap intak sehingga fungsi organ vital tidak berbahaya saat luka. Keseimbangan dinamis antara sel endotel, trombosit, koagulasi dan fibrinolisis mengatur haemostasis dan

menentukan jumlah deposit fibrin pada sisi luka dan berpengaruh pada peningkatan proses reparasi. Bersama-sama dengan proses haemostasis, kaskade koagulasi diaktifkan melalui proses ekstrinsik dan intrinsik, yang menyebabkan terjadinya agregasi platelet dan pembentukan bekuan untuk mengurangi hilangnya darah. Meluapnya darah pada sisi *injury*, komponen darah dan platelet akan berinteraksi dengan kolagen dan *extracellular matrix component* (ECM) lainnya. Kontak tersebut akan mengeluarkan faktor pembekuan dari platelet dan pembentukan bekuan darah yang tersusun dari fibronectin, fibrin, vitronectin dan thrombospondin. Bekuan darah dan platelet tersebut akan terperangkap dan juga menyediakan provisional matriks untuk migrasi sel pada fase haemostasis dan fase inflamasi. Sitoplasma platelet berisi α granule yang berisi *growth factor* dan *cytokine* seperti *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* β (TGF- β), *epidermal growth factor* dan *insulin like growth factor*. Molekul tersebutlah sebagai promotor penyembuhan luka dan mengaktifasi dan menarik neutrofil kemudian makrofag, sel endotel dan fibroblast (Velnar et al.,2009).

Growth factors involved in wound healing					
Factor	Released from	Action			
TGF- α	Macrophages Platelets	Formation of granulation tissue Stimulates proliferation of epithelial cell and fibroblasts	TNF- α	Platelets	Increase vascular permeability Chemotaxis Nitric oxide release Activation of other growth factors
TGF- β	Platelets Neutrophils Macrophages Fibroblasts	Chemotaxis Transdifferentiation of fibroblasts to myofibroblasts Collagen matrix construction Stimulates angiogenesis Wound contraction Release of other growth factors MMP stimulation	PGE ₂	Keratinocytes, Macrophages, Endothelial cells	Vasodilation Platelet disaggregation Increased vascular permeability Pain Fever
PDGF	Platelets Fibroblasts Endothelial cells Macrophages	Chemotaxis Fibroblast proliferation Collagen deposition	Thromboxane A ₂	Platelets	Platelet aggregation Vasoconstriction
VEGF	Platelets Neutrophils Keratinocytes	Stimulate angiogenesis Neovascularization	Leukotrienes	Platelets Leukocytes	Increased vascular permeability Chemotaxis Leukocyte adhesion Chemotaxis (neutrophils)
Serotonin	Platelets	Vasoconstriction Platelet aggregation Chemotaxis	Interleukin-1	Platelets Endothelial cells Lymphocytes	Chemotaxis
TNF- α	Platelets	Increase vascular permeability Chemotaxis Nitric oxide release	Lipoxins	Platelets Leukocytes	Dampen inflammatory response Inhibit chemotaxis (neutrophils)
			Interferon- γ	Fibroblasts Lymphocytes	Macrophage maturation Nitric oxide release

TGF: Transforming growth factor; PDGF: Platelet derived growth factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor; TNF: Tumour necrosis factor; PGE₂: Prostaglandin E₂; FGF: Fibroblast growth factor; EGF: Epidermal growth factor; MMP: matrix metalloproteinases.

Gambar 1. Growth factor yang terlibat dalam penyembuhan luka

Menurut Shailendra et al pada *basic science* untuk mencegah hilangnya darah maka terdapat 3 kunci mekanisme pembentukan bekuan yaitu:

1. Jalur intrinsik kaskade pembekuan (mekanisme aktivasi kontak).

Kerusakan sel endotel sebagai hasil *tissue injury* akan mengenai jaringan sub endotelial hingga darah yang menyebabkan aktivasi faktor X (*Hageman factor*). Hal tersebut akan menginisiasi kaskade pembelahan proteolitik yang akan mengaktivasi faktor X yang mengubah protrombin menjadi trombin sehingga terjadi perubahan fibrinogen menjadi fibrin dan pembentukan gumpalan fibrin (*fibrin plug*).

2. Jalur ekstrinsik kaskade pembekuan (mekanisme faktor jaringan).

Kerusakan endotel menyebabkan adanya paparan faktor jaringan (yang paling sering yaitu sel) ke sirkulasi darah. Hal tersebut menyebabkan aktivasi faktor VII dan mekanisme ekstrinsik kaskade pembekuan yang menyebabkan aktivasi trombin

3. Aktivasi platelet. Diikuti oleh aktivasi trombin, thromboxane atau ADP, platelet mengalami perubahan morfologi dan mengeluarkan isinya yaitu granule alfa dan granule padat. Platelet yang aktif akan melekat dan menggumpal pada sisi yang terpapar kolagen untuk membentuk gumpalan platelet dan menahan sementara pendarahan. Gumpalan ini akan dikuatkan oleh fibrin dan faktor *von Willebrand* sebagai filamen aktin dan miosin dengan platelet.

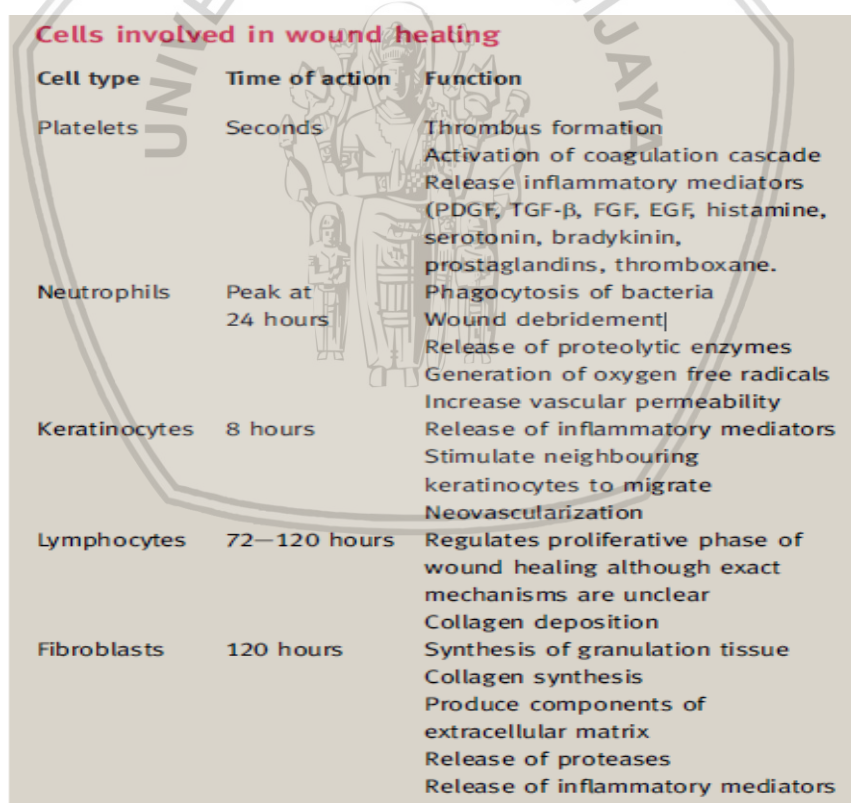
Dalam beberapa menit berkurangnya aliran darah oleh karena konstriksi arteriol menyebabkan jaringan hipoxia dan acidosis. Hal tersebut menimbulkan produksi *nirtic oxide*, *adenosine* dan *vasoactive*

metabolite lainnya yang menyebabkan refleks vasodilatasi dan relaksasi pembuluh arterial. Secara simultan histamin akan keluar dari mast cell dan juga akan meningkatkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas vaskuler, memfasilitasi masuknya sel inflamasi ke ruang ekstraseluler sekitar luka. Hal tersebut menjelaskan adanya panas, merah, bengkak pada awal munculnya luka (Shailendra et al., 2017)

2. Fase inflamasi

Neutrofil merupakan *first responders* yang sangat motile yang menginfiltrasi luka dalam beberapa jam dan migrasi dalam 48 jam pertama. Hal tersebut diperantarai beberapa mekanisme sinyal termasuk kaskade komplemen, aktivasi interleukin dan *signalling* TGF- β yang memicu neutrofil melewati gradien kimia luka yang disebut kemotaksis. Neutrofil memiliki 3 mekanisme utama dalam merusak debris dan bakteri. Pertama, mereka secara langsung akan memakan dan merusak partikel asing, proses tersebut disebut fagositosis. Kedua, neutrofil dapat mendegradasi dan mengeluarkan bahan *toxic* (lactoferrin, protease, neutrofil elastase dan cathepsin) yang akan merusak bakteri sebagai jaringan host yang mati. Penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa neutrofil juga memproduksi kromatin dan protease yang menangkap dan membunuh bakteri di ruang ekstraseluler. Radikal oksigen bebas diproduksi dari aktivitas neutrofil yang diketahui sebagai bahan bakterisidal tapi dapat bersatu dengan klorin untuk mensterilkan luka. Ketika neutrofil menyelesaikan tugasnya maka neutrofil akan apoptosis dan keluar dari permukaan luka atau di fagositosis oleh makrofag (Shailendra et al., 2017)

Makrofag merupakan sel fagositosis yang lebih besar dan konsentrasi tertinggi pada luka pada saat 48-72 jam setelah luka. Makrofag ditarik ke sisi luka oleh *chemical messenger* yang dikeluarkan oleh platelet dan sel yang rusak dan dapat bertahan dalam lingkungan asam. Makrofag merupakan penyedia utama *growth factor* seperti TGF β dan EGF yang mana sangat penting dalam meregulasi respon inflamasi, menstimulasi angiogenesis, membentuk pembentukan jaringan granulasi. Limfosit muncul pada luka setelah 72 jam dan sangat penting dalam meregulasi penyembuhan luka melalui produksi ekstraselular matriks dan *remodelling* kolagen (Shailendra et al., 2017).



Cell type	Time of action	Function
Platelets	Seconds	Thrombus formation Activation of coagulation cascade Release inflammatory mediators (PDGF, TGF- β , FGF, EGF, histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, thromboxane.
Neutrophils	Peak at 24 hours	Phagocytosis of bacteria Wound debridement Release of proteolytic enzymes Generation of oxygen free radicals
Keratinocytes	8 hours	Increase vascular permeability Release of inflammatory mediators Stimulate neighbouring keratinocytes to migrate Neovascularization
Lymphocytes	72–120 hours	Regulates proliferative phase of wound healing although exact mechanisms are unclear
Fibroblasts	120 hours	Collagen deposition Synthesis of granulation tissue Collagen synthesis Produce components of extracellular matrix Release of proteases Release of inflammatory mediators

Gambar 2. Sel yang terlibat dalam penyembuhan luka (Shailendra et al, 2017)

3. Fase proliferasi

Ketika stimulus *injury* telah berhenti, haemostasis telah terjadi, respon inflamasi telah seimbang dan lukanya bebas debris, tahap proliferaatif akan mulai memperbaiki kerusakan. Proses kompleks yang terlibat yaitu angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi, deposisi kolagen, epitelisasi dan retraksi luka akan terjadi secara stimultan (Shailendra et al., 2017)

4. Fase penyembuhan (*remodelling*)

Tahap akhir proses penyembuhan luka dapat mencapai hingga 2 tahun dalam perkembangan normal epitel dan maturasi jaringan scar. Pada fase ini terlibat keseimbangan sintesis dan degradasi seperti kolagen dan deposit protein lainnya pada luka menjadi meningkat. Sehingga akan membentuk struktur yang serupa seperti jaringan yang tidak luka (mengganti kolagen tipe 1 dengan kolagen tipe 3). Walaupun demikian luka tersebut tidak akan sama level kekuatannya, mencapai 50% daya regang dalam 3 bulan dan hanya 80% hingga akhir. Sebagai maturasi scar, level vaskularitas berkurang dan scar berubah dari merah menjadi pink hingga abu-abu dengan waktu tertentu (Shailendra et al., 2017)

2.3 PEMBULUH DARAH

Pembuluh darah merupakan jaringan yang terbentuk dalam suatu proses angiogenesis (Carranza, 2006). Pembentukan pembuluh darah baru merupakan faktor yang berperan dalam tingkat sel. Proses ini merupakan proses proliferasi endotel yang terus menerus membentuk jaringan vaskuler yang menunjang semua kebutuhan sel selama fase penyembuhan luka (Carranza, 2006).

Proses pembentukan pembuluh darah diawali dengan dikeluarkannya *growth factor* oleh daerah yang mengalami kerusakan, baik diproduksi oleh makrofag ataupun sel lain. Kemudian *angiogenic growth factor* akan berikatan dengan reseptor pada permukaan sel endotel pembuluh darah (*parent vessels*). *Growth factor* tersebut akan mengaktifasi sinyal pertumbuhan pada sel endotel. Sel endotel akan berproliferasi dan membentuk cabang menembus membran basal serta bermigrasi menuju daerah luka menggunakan molekul adhesi permukaan sel yang disebut integrin. Lalu menuju daerah luka enzim MMPs akan melarutkan jaringan sekitarnya di bagian depan tunas pembuluh darah. Tunas vaskular akan membentuk kanal tubular untuk membentuk *vascular loops* yang akan berkembang menjadi ujung vena dan ujung arteri. Pembuluh darah akan mengalami maturasi dan menarik *mural cells* (sel otot polos dan *pericytes*) untuk menstabilkan struktur vaskular dan darah akan mulai mengalir pada pembuluh darah yang sudah stabil (William, 2003)

2.4 SEL ENDOTEL

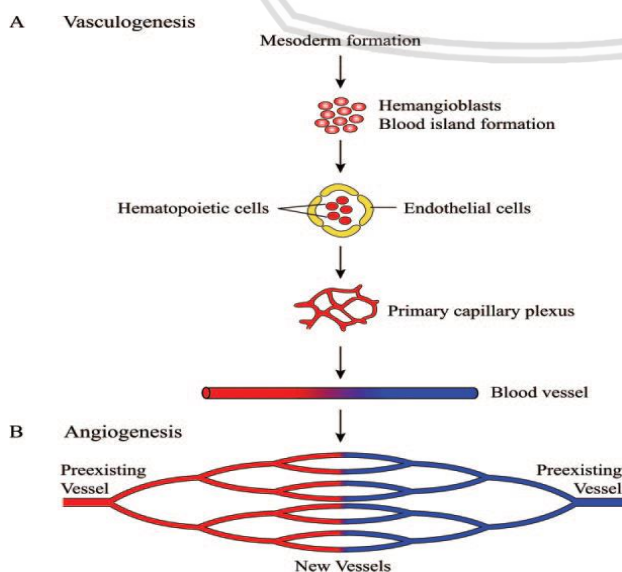
2.4.1 Definisi

Sel endotel merupakan sel-sel yang membentuk endothelium. Sedangkan endothelium adalah lapisan tipis sel-sel yang melapisi permukaan bagian pembuluh darah dan pembuluh limfatik, yang membentuk batas antara sirkulasi aliran darah dan getah bening di lumen pembuluh darah. Sel endotel yang berkontak dengan darah disebut sel endotel vaskular sedangkan sel endotel yang berkontak dengan getah bening disebut sel endotel limfatik. Sel endotel berfungsi sebagai *barrier* terhadap difusi makromolekul ke jaringan, pengaturan tonus otot

polos pembuluh darah, haemostasis dan koagulasi, serta pertahanan tubuh dan angiogenesis (Tortora et al., 2011; Nurhidayat, 2010)

2.4.2 Pembentukan Sel Endotel

Sel endotel terbentuk dari diferensiasi sel mesodermal menjadi hemangioblast yang mengarah ke pembentukan struktur vaskular pertama yang disebut *primitive blood island*. Hemangioblast perifer berdiferensiasi menjadi angioblast yang menjadi prekursor sel endotel yang matang, sedangkan hemangioblast yang di pusat menghasilkan hematopoietic stem cells. Dengan pengaruh *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*, angioblast dan sel-sel endotel yang baru migrasi ke matriks yang tersusun terutama dari kolagen dan hyaluronan, sehingga terjadi fusi dari *blood island*, remodelling menjadi struktur tubuler dan terbentuk primitive vaskular plexus yang pertama. Tubulus ini mengalami pembentukan pembuluh darah atau vasculogenesis sehingga menjadi pembuluh darah baru yang besar. Proses ini membutuhkan banyak proses fisiologi maupun patologis, seperti perkembangan embrio, penyembuhan luka, regenerasi jaringan dan tumor *growth*. Proses ini diregulasi oleh keseimbangan antara pro dan *antiangiogenic agents* (Lamalice et al., 2007)



Gambar 3.

Pembentukan sel endotel dari formasi mesoderm lalu pembentukan sel endotel hingga terjadinya pembentukan pembuluh darah baru

2.4.3 Migrasi Sel

Mekanisme migrasi sel endotel meliputi 3 mekanisme utama yaitu kemotaksis adalah migrasi secara langsung ke konsentrasi yang menarik sel tersebut ketempat terjadinya inflamasi, haptotaxis adalah migrasi secara langsung ke konsentrasi gradient ligand yang berdiam, dan mekanotaksis adalah migrasi secara langsung karena adanya kekuatan mekanikal. Kemotaksis sel endotel merupakan pengaruh dari *growth factor* seperti VEGF and kemudian haptotaksis berhubungan dengan peningkatan migrasi sel endotel yang mengaktifkan respon integrin yang berikatan dengan komponen ECM. Lokasi sel endotel terdapat di dalam permukaan pembuluh darah, yang secara langsung selalu kontak dengan *stress* yang menyebabkan terjadinya proses migrasi. Dengan demikian tegangan *stress* tersebut menginisiasi mekanotaxis dan memodulasi beberapa proses migrasi seperti perluasan ke sisi tepi, adhesi ke matriks dan menempel ke bagian belakang. Oleh karena itu migrasi merupakan proses molekular mekanis yang terintegrasi melibatkan proses dinamis, koordinasi adhesi perubahan sel, dan pembentukan dan pergerakan sitoskeletal (Lamalice et al., 2007).

2.4.4 Kemotaksis Migrasi Sel Endotel

Banyak sitokin yang berbeda terlibat dalam regulasi kemotaksis migrasi sel endotel selama angiogenesis. Ada 3 promotor utama dari jenis motilitas berbasis aktin adalah VEGF, bFGF, dan angiopoietin. Sitokin lainnya meliputi: FGF-2, faktor *hepatocyte growth factor*, *platelet derived growth factor (PDGF)*, faktor pertumbuhan epidermal, *transforming growth factor*, interleukin, tumor nekrosis faktor (TNF), *platelet activating factor*, ephrins, molekul adhesi terlarut, endoglin, dan angiogenin (Lamalice et al., 2007)

2.4.5 Disfungsi Endotel

Disfungsi endotel merupakan ketidakseimbangan antara faktor relaksasi dan konstiksi endotel, antara mediator prokoagulan dan antikoagulan, atau antara zat-zat yang mendorong serta menghambat pertumbuhan. Disfungsi endotel terjadi karena penebalan matriks subendotel, misalnya pada aterosklerosis yang menyebabkan NO sulit masuk otot polos (Sargowo, 2003)

2.4.6 Kultur *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs)

Kultur sel merupakan sel yang dapat hidup secara in vitro dan masih mempunyai sifat-sifat mirip dengan sel asalnya, lepas dari pengaruh sistemik, sel tersebut akan berproliferasi tetapi masih dalam keadaan tidak berdiferensiasi. Kultur sel merupakan metode untuk mempelajari perubahan fungsi sel/jaringan tanpa pengaruh sistemik. Kultur sel dimulai dengan meletakkan fragment di cawan kultur lalu menanam sel embrionik kemudian diamati selnya di mikroskop dalam pengamatan mikroskopis sel (Noor,2013)

Kultur HUVECs merupakan kultur jaringan yang diperoleh dari sel endotel vena umbilikus manusia dengan media yang memungkinkan HUVECs dapat tumbuh (Nurhidayat,2010). Kultur HUVECs merupakan model penelitian yang tepat dalam mempelajari struktur dan fungsi dari sel endotel terhadap stimulus eksogen (Liu et al.,2011)

2.5 CADMIUM

2.5.1 Struktur Kimia dan Gambaran Umum

Cadmium merupakan logam yang terletak pada tabel periodik antara element zinc (Zn) dan merkuri (Hg) dengan sifat kimia yang sama dengan Zn. *Cadmium* merupakan kation divalent yang berikatan kompleks dengan element

lainnya seperti CdCl_2 . Cd ada di lapisan kerak bumi sekitar 0,1 bagian per juta. Biasanya ditemukan tidak murni atau campuran dengan deposit Zn atau timah (Pb), oleh karena itu secara utama diproduksi sebagai hasil sampingan dari peleburan Zn atau Pb (Bernhoft, 2013). Secara komersial Cd digunakan pada layar televisi, baterai, pigment melukis, kosmetik dan lapisan baja (Bernhoft, 2013).

2.5.2 Metabolisme *Cadmium*

Manusia terpapar *cadmium* sebagian besar melalui saluran pernapasan atau saluran pencernaan. Lima sampai 50 % debu cadmium akan diabsorbsi tergantung dari ukuran partikelnya. Absorpsi melalui kontak kulit tidak terlalu diperhatikan. Sekitar 5-10 % *cadmium* yang tertelan akan diserap tergantung pada ukuran partikelnya. Penyerapan diusus akan semakin besar pada orang yang kekurangan zat besi, kalsium dan zink (Bernhoft, 2013).

Paparan *cadmium* juga didapatkan dari saluran pencernaan dari makanan yang terkontaminasi seperti udang, daging, buah dan sayur, nasi dari daerah tertentu seperti di Cina dan Jepang atau air yang terkontaminasi dari Zn/Pb dari pipa air yang disegel atau polusi industri dan dapat menyebabkan masalah kesehatan jangka panjang. Setelah diabsorpsi Cd akan ditransportasikan ke tubuh, dan biasanya akan berikatan dengan sulfhydryl yang terdapat protein seperti methallotionine. Sekitar 30 % akan di deposit di hati, 30 % di ginjal, dan sisanya akan tersebar ke seluruh tubuh dengan waktu paruh pembersihan sekitar 25 tahun. Waktu paruh *cadmium* dalam darah diperkirakan sekitar 75-128 hari, tapi waktu paruh ini secara utama ada deposit di organ dan tidak benar-benar bersih dari tubuh. Sehingga rambut, urin dan darah merupakan penanda yang buruk untuk merefleksikan adanya paparan baru, tapi juga benar bahwa dapat menunjukkan

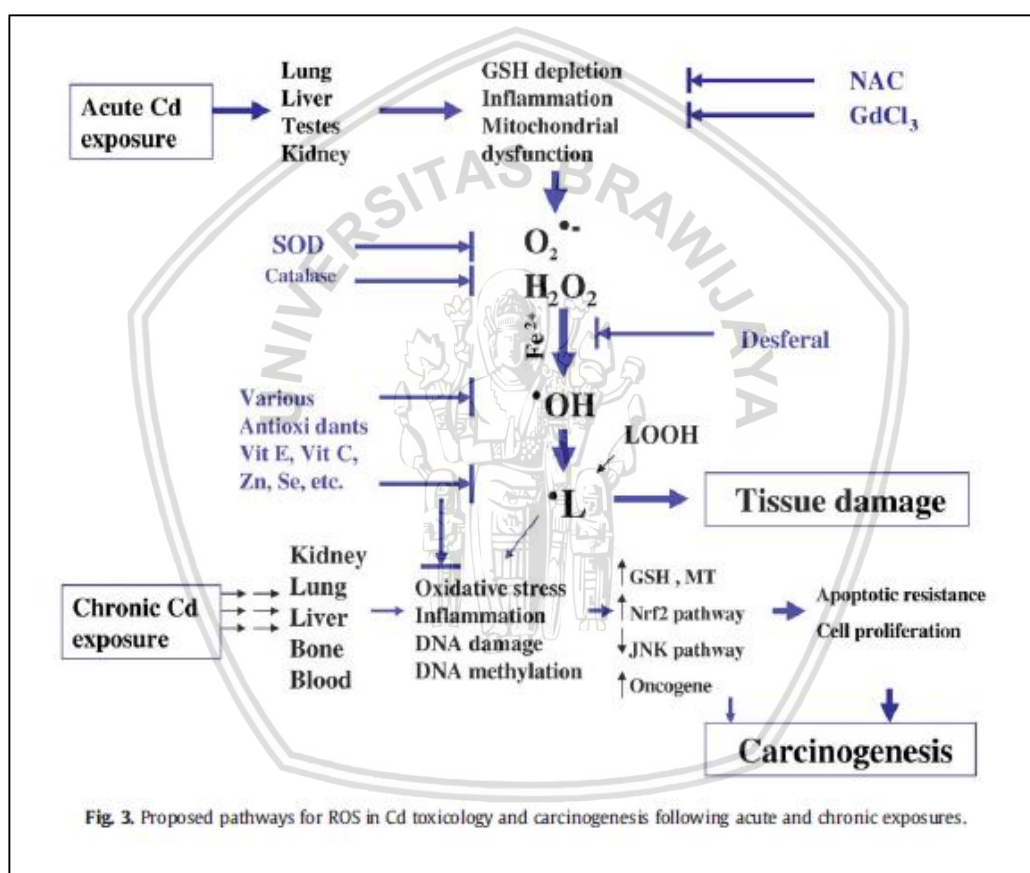
adanya logam berat lainnya. *Test provocation* urin madalah pengukuran yang tepat dalam memperkirakan beban cadmium yang ada dalam tubuh (Bernhoft, 2013)

2.5.3 Toksisitas *Cadmium*

Cadmium menyebabkan stress oksidatif dan kerusakan histopatologi pada membran sistem saraf pusat dengan mereduksi asetilkolinesterase, meningkatkan stress oksidatif, menghabiskan glutathione, superperoxide dismutase, dan antioksidan lainnya, menghabiskan katalase, glutathione peroksida, glutathione S transferase. Perubahan ini menyebabkan apoptosis pada sel kortikal di saraf pusat (Bernhoft, 2013)

Cadmium merupakan bukan logam fenton, sehingga tidak menghasilkan ROS secara langsung. Ada 3 mekanisme *cadmium* menghasilkan ROS. Pertama *cadmium* akan membebaskan logam aktif redoks seperti besi dan cooper dari sitoplasma dan protein membran termasuk feritin yang menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi ion besi yang tidak terikat. Ion besi yang tidak terikat ini yang menyebabkan reaksi oksidatif melalui reaksi fenton (Waisberg et al., 2003). Kedua *cadmium* menghambat rantai transport elektron sehingga menghasilkan aliran elektron tidak berpasangan dan ROS. *Cadmium* juga menghambat aktivitas kompleks II dan kompleks III di dalam mitokondria. Ketidakmampuan transfer elektron melalui kompleks III dengan *cadmium* mungkin karena pengikatan *cadmium* dengan semi ubiquinone dan sitokrom b kompleks III yang mengakibatkan akumulasi semi ubiquinone tidak stabil, sehingga menyebabkan kebocoran elektron untuk molekul oksigen membentuk O₂ (Wang et al., 2004). Ketiga, *cadmium* menghabiskan *scavenger* antioksidan. Glutathione (GSH) merupakan target utama dari *cadmium*. Diketahui bahwa toksisitas *cadmium* biasanya terkait dengan menipisnya GSH seluler dan kelompok sulfhidril protein

terikat yang menyebabkan gangguan keseimbangan redoks selular yang mengarah pada peningkatan produksi ROS seperti $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 dan OH^{\bullet} (Liu & Jan, 2000). Sehingga akhirnya paparan cadmium menekan enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathione peroxidase (Gpx). Perubahan enzim antioksidan tersebut bergantung pada durasi dan konsentrasi paparan cadmium (Waisberg et al., 2003)



Gambar 4 Cara jalur ROS pada *toxicology* cadmium dan carcinogenesis pada paparan akut dan kronis

2.6 Pisang Ambon

2.6.1 Taxonomi Pisang Ambon

Pisang merupakan tanaman tropis yang diketahui banyak orang. Dari asal mulanya berasal dari Pasific Barat Daya, tanaman pisang menyebar ke India sekitar tahun 600 SM dan kemudian menyebar ke daerah tropis di seluruh dunia.

Hal tersebut memungkinkan dunia untuk mengolah hasil panen sejak lama. Bahkan telah menyebar ke pulau Pasific dan pantai barat Afrika pada awal 200-300 SM.

Klasifikasi tanaman pisang menurut *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research* dalam *a review on phytochemistry and pharmacology Musa Paradisiaca* (Lavanya,2016) adalah sebagai berikut:

Taxonomy

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Super division : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Class : Liliopsida

Subclass : Zingiberidae

Order : Zingiberales

Persamaan nama dari tanaman pisang

English : Banana tree

Hindi : Kelaa, Kelaa kaa phuul

Tamil : Vazhei

Telugu : Artipandu

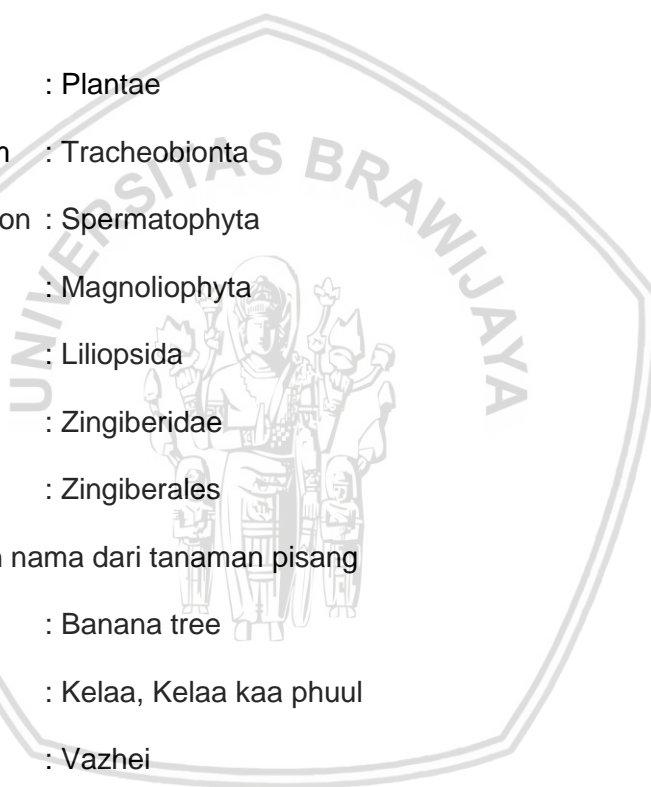
Kannada : Balayhanu

Malayalam : Pisang

Gujarati : Kel phool

French : Banane

Thailand : Kluai



Gambar 5(a) *Musa paradisiaca*(b) *Musa sapientum*

2.6.2 Distribusi pisang Ambon

Pisang berasal dari wilayah Indo-Malaysia sampai ke utara Australia, dikenal di wilayah Mediterania pada abad ke-3 SM dan diyakini pertama kali dibawa ke Eropa pada abad ke-1 setelah masehi. Pada awal di abad ke-16, pelaut Portugis mengangkut tanaman dari pantai Afrika Barat ke Amerika Selatan. Bahkan menyebar ke Kepulauan Pasifik dan Pantai Barat Afrika sejak awal 200-300 SM. Di berbagai negara sekitar 300 varietas dari pisang yang tumbuh, yang sebagian besar telah berkembang di Asia, Indo-Malaysia dan Australia tropis dan sekarang banyak ditemukan di seluruh tropis dan negara subtropis. India, Filipina, China, Brasil, Indonesia, Meksiko, Kolombia, Thailand adalah negara penghasil pisang teratas. Pisang dan pisang raja sekarang ini tumbuh di setiap daerah tropis lembab dan merupakan hasil panen tanaman buah terbesar keempat di dunia, setelah buah anggur, buah sitrus dan apel (Lavanya, 2016).

2.6.3 Morfologi Pisang Ambon

Musa paradisiaca merupakan tanaman herbal yang tingginya hingga 9 m dengan batang palsu yang kuat, mahkotanya memanjang berbentuk oval dengan daun warna hijau gelap (sekitar 365 cm panjangnya dan 61 lebarnya) dengan pelepah yang menonjol lebar, setiap tanaman menghasilkan perbungaan tunggal

seperti lonjakan yang terkulai, dan daun pelindung besar yang dibuka secara berurutan, oval, panjang 15-20 cm, cekung, warna merah tua dan seperti berdaging. Buahnya berbentuk persegi panjang, berdaging, panjangnya 5-7 cm dan lebih panjang pada varietas yang dibudidayakan. *Musa sapientum* merupakan pohon herbal yang tumbuh setinggi 5 - 9 m, dengan rimpang umbi-umbian, batang palsu yang keras, panjang. Perbungaan besar dengan jantung coklat kemerahan dan dimakan sebagai sayuran. Buah yang sudah matang manis, lunak dan penuh dengan biji dan kulitnya lebih tebal dibanding pisang lainnya (Zafar,2011)

2.6.4 Kegunaan secara tradisional

Semua bagian pada tanaman pisang memiliki kegunaan dalam bidang kesehatan. Bunga dari pohon pisang dapat digunakan untuk mengatasi bronkitis, disentri, menorrhagia dan ulcer. Bunga yang dimasak digunakan untuk mengatasi diabetes. Getah tanaman yaitu astringent diberikan dalam kasus histeria, epilepsi, kusta, demam, perdarahan, disentri dan diare, dan digunakan pada wasir, serangga dan sengatan dan gigitan lainnya. Daun yang muda digunakan sebagai kain kompresan untuk meredakan bengkak pada luka bakar dan perlukaan pada kulit lainnya. Abu astringent dari kulit mentah dan daunnya digunakan dalam disentri dan diare dan juga digunakan untuk mengobati ulkus kronis. Akarnya diberikan pada gangguan pencernaan, disentri dan penyakit lainnya. Juga memiliki kegunaan anti helmintik. Benih biji pisang diberikan dalam kasus katarak dan diare di India. Anti jamur dan sifat antibiotik ditemukan pada kulitnya dan bubur pisang yang sudah matang. Tanaman ini juga digunakan di Indonesia dalam peradangan, nyeri dan gigitan ular (Lavanya, 2016)

2.6.5 Kandungan Getah Batang Pisang

Getah batang pohon pisang mengandung beberapa jenis fitokimia dengan kandungan fitokimia paling banyak yaitu saponin, lalu flavonoid, tanin dan lektin dan tidak mengandung alkaloid, steroid, dan triterpenoid (Wijaya, 2010).

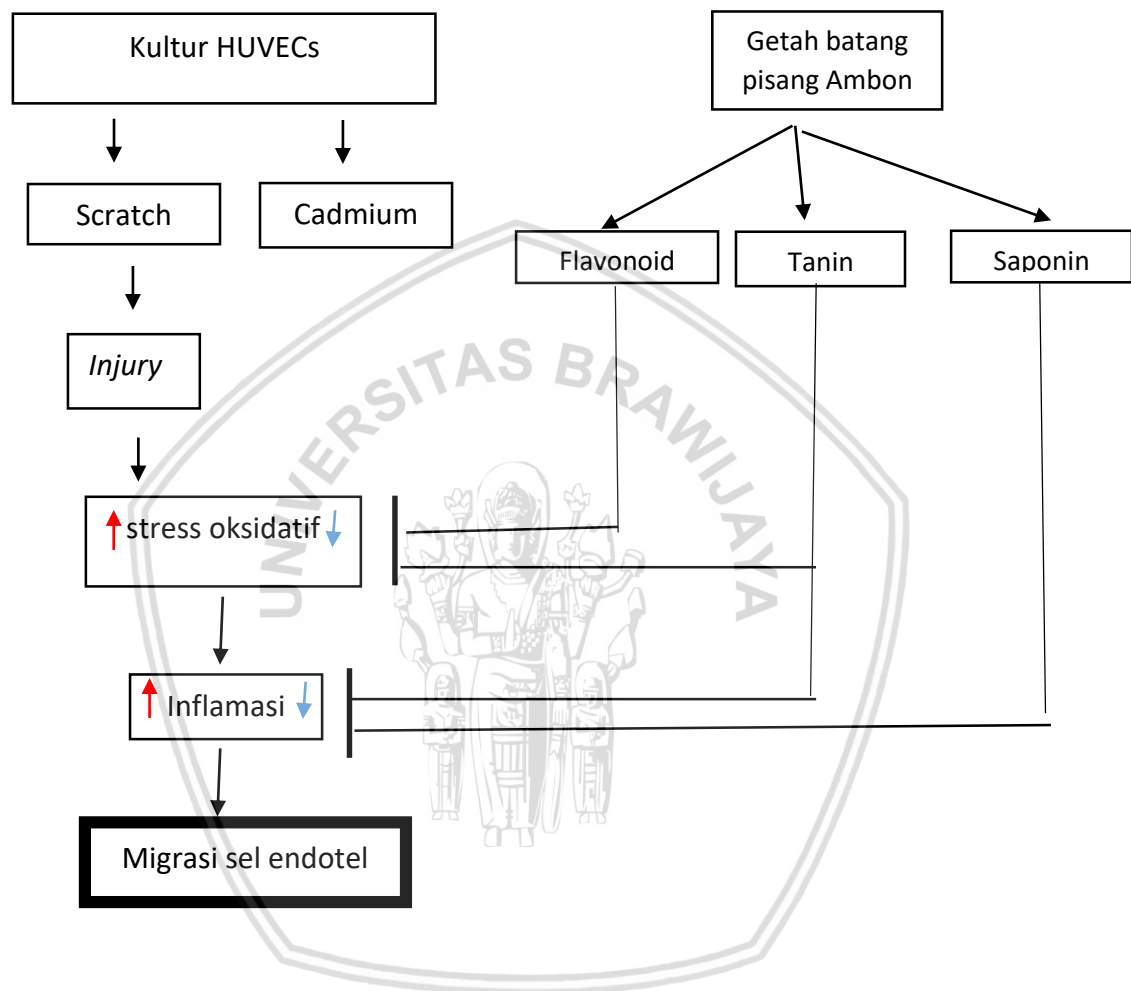
Efek saponin pada metabolisme matriks seluler melalui aktivasi dan sintesis TGF- β dan reseptor TGF β pada fibroblas telah diamati untuk mengamati kontribusi jalur TGF β pada mekanisme penyembuhan luka yang diperantarai oleh saponin (Kanzaki et al., 2009). Flavonoid adalah antioksidan potensial yang larut dalam air yang mencegah kerusakan sel dan mencegah aktivitas antikanker. Flavonoid juga memberikan aktivitas antiinflamasi (Harisaranraj et al., 2009; Hasanoglu et al., 2001). Flavonoid bekerja dengan cara menghambat enzim lipooksigenase. Hal tersebut dikarenakan flavonoid dapat menghambat fosfodietrase, aldoreduktase, monoamina oksidase dan lipooksigenase dan hal tersebut akan mengurangi gejala inflamasi dan mengurangi rasa sakit (Dani, 2012)

Sedangkan zat tanin bersifat antiseptik serta mengandung vitamin A, B, C, air, dan zat tepung. Ekstrak tanin terbukti sebagai antioksidan yang kuat dan antibakteri karena merusak sel bakteri. Tanin memicu penyembuhan luka melalui beberapa mekanisme seluler, yaitu dengan membuang radikal bebas dan memicu pembentukan fibroblas dan pembuluh darah (Lai et al., 2011)

Kandungan lektin yang terdapat dalam getah pisang juga berfungsi untuk menstimulasi pertumbuhan sel kulit. Lektin terbukti dapat mempercepat penyembuhan luka mukosa oral tikus melalui peningkatan produksi TGF α dan VEGF. Hasilnya adalah proses penyembuhan dengan reepitelisasi yang lebih awal, inflamasi yang lebih ringan, formasi serabut kolagen yang lebih meningkat, dan kematangan jaringan granular yang lebih cepat (Kim et al., 2013)

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN



Keterangan:

- ↑ : Meningkatkan
- ↓ : Menurunkan
- ▭ : Variabel yang diteliti
- : Yang mempengaruhi
- T : Dihambat

Hipotesis Penelitian

Getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*) dapat meningkatkan migrasi sel endotel pada kultur sel HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang di *scrath* serta diinduksi logam berat *cadmium*.

Road Map Kerangka Konsep Penelitian

Penelitian ini dilakukan karena berdasarkan penelitian dan sumber-sumber sebelumnya bahwa getah pisang Ambon memiliki efektivitas dalam penyembuhan luka. Oleh karena itu pada penelitian ini akan menggunakan sel HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang akan di inflamasi secara mekanis dengan cara *scrath* lalu diberikan paparan logam berat yaitu *cadmium* lalu pada medium kultur sel endotel tersebut akan diberikan getah batang pisang Ambon dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Pada penelitian ini variabel berupa migrasi sel endotel akan diamati dengan cara melihat penyembuhan luka dengan metode *scratch (Wound healing Assay)*. Pada penelitian ini diharapkan kedepannya agar dapat menggunakan bahan aktif dalam pisang Ambon tersebut sebagai agen penyembuh luka.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Rancangan

Penelitian ini menggunakan eksperimen yang dilakukan di laboratorium Biomedik FK-UB secara in-vitro dengan desain *Post Test Only Control Group Desain*. Pada rancangan ini akan dilakukan pengukuran dari perlakuan yang diberikan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok perlakuan pertama hingga kelompok perlakuan ketiga dengan kelompok kontrol. Rancangan ini memiliki 5 kelompok yang ditentukan secara acak yaitu 1 kelompok kontrol (kelompok yang tidak diberikan perlakuan khusus), 1 kelompok pembanding (kelompok yang diberikan perlakuan biasa yang digunakan sebagai intervensi) dan 3 kelompok eksperimen (kelompok yang diberikan perlakuan khusus diantara ketiganya).

4.2 Sampel

Kultur sel endotel yang diambil dari umbilikus atau dikenal dengan HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang didapatkan dari bayi baru lahir yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.3 Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria inklusi dari pengambilan umbilikus pada penelitian ini adalah pada bayi yang baru lahir secara normal, persalinan dengan Sectio Cesarea tanpa pendarahan atau persalinan spontan dengan menggunakan 2 duk steril, tidak dengan pre-eklampsia, infeksi, hipertensi, DM, ataupun ketuban pecah dini.

Seluruh kegiatan harus disetujui oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

❖ Kriteria inklusi

- a) Ibu sehat dengan kriteria $Hb > 11$
- b) Persalinan pervaginam/sectio dan bayi sehat dengan kriteria ($BB > 2,5\text{kg}$). Apgar score 7-9

❖ Kriteria eksklusi

- a) Ibu menderita hipertensi ($TD > 120\text{ mmHG}$), diabetes ($GD > 200\text{mm/dl}$), jantung koroner, ketuban pecah dini, preeklampsia, dan hiperlipidemia.

4.4 Pengulangan (Replikasi)

Jumlah sampel pada penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok (1 kelompok kultur HUVEC yang di *scratch*, 1 kelompok yang di *scratch* dan diperparah *cadmium* sebagai kelompok kontrol dan 3 kelompok kultur HUVEC yang dipapar dengan getah pisang Ambon dengan kadar prosentase 0,125%, 0,25%, dan 0,5% sebagai kelompok perlakuan. Pengulangan pada penelitian ini dilakukan 4 kali pengulangan untuk masing-masing kelompoknya.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini dibagi menjadi 3 variabel yaitu:

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah getah batang pisang Ambon yang dipapar pada kelompok perlakuan. Konsentrasi getah pisang yang

dipapar pada kultur HUVECs adalah 0,125%, 0,25%, dan 0,5%. Kelompok terbagi menjadi 5 kelompok:

- a. Kelompok kontrol negatif (K-) : Kultur HUVECs yang dilakukan *scratch*
- b. Kelompok kontrol positif (K+) : Kultur HUVEC yang dilakukan *scratch* dan diperparah dengan logam berat *cadmium*
- c. Kelompok perlakuan I (P1) : Kultur HUVEC yang dilakukan *scratch* dan diperparah dengan *cadmium* dipapar dengan getah batang pisang Ambon konsentrasi 0,125%
- d. Kelompok perlakuan II (P2) : Kultur HUVEC yang dilakukan *scratch* dan diperparah dengan *cadmium* dipapar dengan getah batang pisang Ambon konsentrasi 0,25%
- e. Kelompok perlakuan III (P3) : Kultur HUVEC yang dilakukan *scratch* dan diperparah dengan *cadmium* dipapar dengan getah batang pisang Ambon konsentrasi 0,5%

4.5.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah tempat penelitian (lab biomedik), lingkungan penelitian, induksi inflamasi berupa *scratch* dan logam berat *cadmium*.

4.5.3 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah migrasi sel endotel pada proses inflamasi pada kultur HUVECs.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dalam jangka waktu \pm 3 bulan

4.7 Definisi Operasional

- a. Kultur sel endotel (HUVECs) berasal dari vena umbilikus bayi yang baru lahir dengan persalinan yang memenuhi kriteria inklusi pada penelitian ini, kemudian dilakukan kultur di laboratorium di dalam *well plate* dan diinkubasi selama beberapa hari. Sel endotel yang digunakan memiliki kriteria monolayer dengan tampilan sel yang berbentuk pipih dengan jarak antar sel yang teratur dan kerapatan/ *confluence* sel nya yaitu 70-80%, pada bagian tengah sel berbentuk bulat dan terang serta sel melekat pada dasar media kultur dengan media yang jernih berwarna merah bata.
- b. Scrath pada kultur HUVECs dilakukan dengan cara melakukan *scratch* dengan menggoreskan ujung pinset steril secara horizontal pada medium kultur HUVECs sehingga membentuk zona bebas dengan lebar ± 1 mm.
- c. Induksi logam berat *cadmium* berasal dari Cd^{2+} dengan kadar 24,154 $\mu\text{g/l}$
- d. Getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*) adalah getah batang pisang yang berasal dari kota Malang. Getah batang pisang diambil dengan cara dipotong secara melintang yang disimpan pada wadah steril yang dilapisi oleh aluminium foil, kemudian dipaparkan ke kultur HUVECs pada masing-masing kelompok perlakuan dengan konsentrasi 50 %, 75%, 100% dengan rumus pengenceran dan disterilisasi dengan filter 0,2 μm saat diberikan ke kultur HUVECs tersebut.
- e. Migrasi sel endotel merupakan jarak perpindahan sel endotel yang diukur dengan metode *scrath/Wound Healing Assay* dengan mengukur penyempitan zona yang bebas dari sel pada jam ke 12, 24, 48 setelah sel HUVECs diberikan perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x. Penyempitan zona bebas sel dihitung dengan rumus

porsentase % migrasi HUVECs = $100 - ([x/y] \times 100) \%$, dengan x merupakan lebar zona bebas sel setelah dilakukan perlakuan dan y merupakan lebar zona bebas sel sebelum diberikan perlakuan. Pengukuran zona dilakukan dengan penggaris pada komputer dari tepi atas ke tepi bawah zona sel bebas (Nugrahenny, 2012)

4.8 Bahan dan Alat Penelitian

4.8.1 Sampel, Alat, dan Bahan Kultur HUVECs

Sampel, Alat, dan Bahan Kultur HUVECs (Jones, 1996) adalah:

a. Media pengambilan umbilikus

- Hank's balance solution (HBSS) sari SIGMA (H1641)
- Gentamycine (Gentamerck)
- Sodium Hydrogen Bicarbonate (SHB) dari SIGMA
- Phenol Red dari SIGMA (P 5530)
- HEPES solution dari SIGMA
- Deionized water (WFI Otsuka)

b. Bahan isolasi sel endotel

Collagenase type II (SIGMA, C 6885), Serum Free, Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (SIGMA, D 1408), Deionized water (WFI Otsuka)

Bahan untuk pembuatan serum free:

- Medium 199 with Hank's Salt, with L-glutamine, without Sodium Bicarbonate (GibcoBRL)
- Pennicilline (~100 μ /ml) SIGMA
- Streptomycine (~100 μ /ml) SIGMA

- Larutan Natrium Bicarbonate (21mM/ml)
- L-Glutamine (2mM/ml) dari SIGMA (G 7513)

c. Bahan media kultur

- Serum free
- Newborn Calf Serum (NCS) dari SIGMA (N 4637)

4.8.2 Instrumen Kultur HUVECs

LAF (*Laminary air flow*) dari ESCO, Incubator CO₂ (Heraeus), Neraca Analitik, lampu ultraviolet, sentrifuge, mikroskop inverted dengan monitor, mikro pipet, spuit 20cc, filter 0,2 µm dan filter holder, spuit 10 cc, cannule, flask 25 cm², bola hisap, pipet volume.

4.9 Prosedur Kerja

Pendekatan yang dilakukan untuk membuktikan hipotesis yaitu dengan melakukan penelitian eksperimental pada HUVECs. Sel endotel digunakan karena sel endotel berperan penting pada proses angiogenesis pada penyembuhan luka. Prosedur kerja sebagai berikut:

4.9.1 Pembuatan larutan HEPES

4,76 gram HEPES dilarutkan dalam 20 ml deionized water, kemudian disterilisasi

4.9.2 Pembuatan larutan bicarbonate phenol red

4,4 gram sodium hydrogen bicarbonate dan 3 mg phenol red dalam 100 ml deionized water dengan pH 7,6, kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 µm dan disimpan pada suhu -20°C

4.9.3 Pembuatan larutan gentamycin

75 mg gentamycin ke dalam 10 ml deionized water kemudian di sterilisasi dengan filter 0,2 µm dan disimpan pada suhu -20°C

4.9.4 Pembuatan medium cord solution

10 HBSS dan tambahkan 90 ml deionized water, ditambahkan 3,75 ml bicarbonate phenol red, 2,5 ml larutan HEPES, 1,25 ml gentamycine dan diukur pH pada 7,4 (warna menyerupai HBSS pekat). Sterilisasi dengan filter 0,2 μ m dan disimpan dengan refrigerator suhu 4 °C

4.9.5 Pembuatan larutan penicilline-Streptomycine (pen-step)

23,95 mg penicilline dan 52,5 mg streptomycine ke dalam 10 ml deionized water, kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 μ m dan disimpan pada suhu -20°C

4.9.6 Pembuatan larutan glutamine

0,292 g L-glutamine dilarutkan ke dalam 10 ml deionized water atau encerkan L-glutamine SIGMA 10 kali dengan deionized water, kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 μ m dan disimpan pada suhu -20°C

4.9.7 Pembuatan medium serum free

1,25ml pen-step dimasukkan ke dalam 100 m M 199 dan ditambahkan 5 ml natrium bicarbonate serta 1,25 ml glutamine, kemudian disterilisasi dengan filter 0,2 μ m dan disimpan dengan refrigerator suhu 4 °C dalam keadaan tertutup aluminium foil.

4.9.8 Pembuatan medium kultur

20 ml serum free pH 7,2 disiapkan dalam kondisi tertutup aluminium foil, kemudian ditambahkan 2,5 ml NCS, diukur pH 7,1, disterilisasi dengan filter 0,2 μ m dan disimpan dengan refrigerator suhu 4 °C dalam keadaan tertutup aluminium foil (digunakan dalam 1 minggu)

4.9.9 Pembuatan larutan collagenase

Larutan collagenase dibuat dengan konsentrasi 0,5 mg/cc, kemudian di sterilisasi dengan filter 0,2 μ m

4.9.10 Pembuatan larutan buffer HEPES 100cc

- NaCl 0,8442 g
- KCl 0,0373 g
- MgCl₂ 0,0203g
- CaCl₂ 0,0368g
- HEPES 0,3904g

4.9.11 Pengambilan umbilikus

- a. Umbilikus diperoleh dari balai kesehatan ibu dan anak dengan persalinan sectio caesarea
- b. Pengerjaan kultur sel endotel tidak melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran
- c. Botol berisi cord solution disiapkan di refrigerator (suhu 4 °C)
- d. Segera setelah kelahiran, umbilikus dipotong \pm 20 cm dan langsung dimasukkan dalam larutan cord solution

4.9.12 Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel

- a. Umbilikus dibersihkan dari jaringan dan clot menggunakan kertas tissue yang disemprot alkohol 70%
- b. Masing-masing ujung umbilikus dipotong secara transversal sehingga terlihat 2 arteri dan 1 vena. Vena akan terlihat mempunyai dinding yang lebih tebal, lebih besar, dan elastis
- c. Cannule dimasukkan pada salah satu ujung vena (\pm 1cm), kemudian diikat erat dengan benang

- d. Vena dibersihkan dengan dibilas 10 ml larutan PBSA melalui cannule yang telah terpasang dengan spuit 20 cc. Setelah bersih, ikat ujung umbilikus yang lain dengan ikatan yang kuat (di klem).
- e. Larutan collagenase dimasukkan melalui cannule yang terpasang dengan spuit 20 cc dan spuit dibiarkan menancap pada cannule. Kemudian umbilikus dihangatkan dengan cara mendekapkan umbilikus dengan kedua tangan dan didekatkan dengan bunsen (agar mencapai suhu $\sim 37^{\circ}\text{C}$) selama 7 menit.
- f. Collagenase yang sudah mengandung sel endotel dikeluarkan dari umbilikus dengan cara menyedot melalui spuit yang masih terpasang pada ujung cannule. Kemudian collagenase tersebut dimasukkan pada tabung sentrifuge steril 15 cc
- g. Umbilikus dibilas dengan 8cc larutan PBS melalui canule yang terpasang dengan spuit 20 cc untuk mendapatkan sel endotel yang masih tersisa. Kemudian disedot kembali melalui spuit yang terpasang pada ujung cannule. Lalu masukan ke dalam tabung sentrifuge steril 15 cc.
- h. Larutan di dalam tabung sentrifuge steril yang telah berisi sel endotel tersebut akan di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 8 menit
- i. Supernatan yang terbentuk tersebut akan dibuang. Lalu tambahkan 4ml medium kultur pada pellet dan lakukan resuspensi dengan cara pippeting hingga sel endotel terpisah

- j. Larutan dipindahkan ke dalam flask 75cm² yang sebelumnya telah dilapisi dengan larutan gelatin 0,2 %, lalu dimasukan ke dalam inkubator CO 5% pada suhu 300 selama 2 jam
- k. Flask diambil lalu diamati dibawah mikroskop inverted dengan embesaran 400 x. Jika sel endotel sudah menempel pada dasar flask maka medium kultur diambil dan sel tersebut dibilas dengan larutan serum free 3ml melalui filter 0,2 μ m
- l. Serum free diambil dengan spuit steril dan digantikan dengan medium kultur 4ml melalui filter 0,2 μ m
- m. Flask dimasukkan ke dalam inkubator sampai terbentuk monolayer seperti cobblestone sekitar 3-4 hari dan medium kultur diganti setiap 2 hari sekali

4.9.13 Pembuatan Sediaan Getah Batang Pisang Ambon

Getah batang pisang Ambon diperoleh dari pohon pisang yang berada di Malang. Batang pohon pisang dipotong secara miring hingga mencapai umbi pisang. Batang pohon pisang diambil dengan berat kira-kira mencapai 250 gram, lalu getahnya diperas dengan menggunakan tangan yang telah memakai *handscoon* lalu cairan getah pisang yang telah diperas ditaruh di dalam wadah yang steril yang tertutup oleh alumunium foil dan disterilisasi dengan filter 0,2 μ m. Pembuatan getah batang pisang Ambon dibagi menjadi 3 konsentrasi berbeda.

4.9.14 Induksi Scrath pada kultur HUVECs

Scratch pada kultur HUVEs dilakukan dengan cara melakukan *scratch* dengan menggoreskan ujung pinset steril secara horizontal pada medium kultur HUVECs sehingga membentuk zona bebas dengan lebar \pm

1mm. Zona bebas tersebut akan dilakukan perhitungan persentase lebar lalu diberikan perlakuan pemberian Cd. Zona bebas tersebut akan dilakukan perhitungan dengan beberapa *time series* lalu diamati berapa persen migrasi sel endotel yang mengalami penyempitan zona bebas tersebut.

4.9.15 Induksi Logam Berat *Cadmium* (Cd)

Medium kultur HUVECs yang telah *confluent* sekitar 80% diganti dengan medium baru, lalu diberikan induksi logam berat yaitu Cd²⁺ dengan konsentrasi 24,154 mg/l berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya. Lalu HUVECs diinkubasi dengan serum free media, lalu dilanjutkan dengan pemberian perlakuan getah pisang.

4.9.16 Pemberian Getah Batang Pisang Ambon

Pemberian getah pisang Ambon pada masing-masing kelompok perlakuan dengan konsentrasi berbeda yaitu 0,125 %, 0,25%, dan 0,5%. Pemberian getah pisang dilakukan dengan cara memaparkan getah pisang steril yang terlindung dengan aluminium foil dengan menggunakan pipet mikro ke dalam medium kultur sel endotel HUVECs sebanyak 50 µl dan diamati dengan beberapa *time series*.

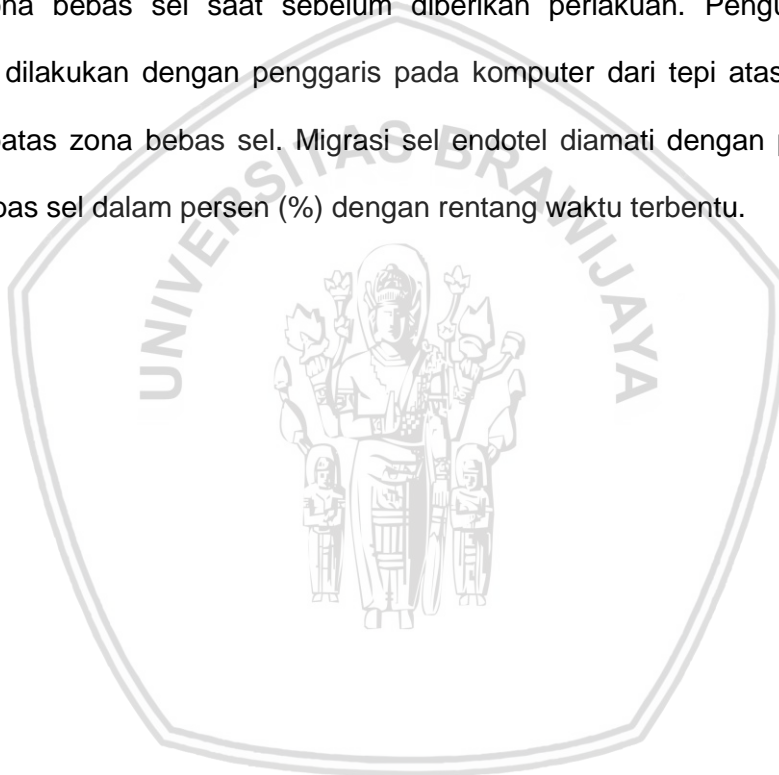
4.10 Penghitungan Migrasi Sel Endotel

Migrasi sel endotel dinilai dengan metode *scrath/Wound Healing Assay* HUVECs monolayer yang digoreskan dengan menggunakan ujung pinset dan menggunakan zona bebas sel dengan lebar ± 1 mm dan diamati dengan beberapa *time series* setelah dipapar dengan pisang Ambon. Migrasi sel endotel diukur dengan mengukur persentase penyempitan zona bebas sel dengan melihat

menggunakan mikroskop inverted perbesaran 400x. Setelah itu hasil penyempitan zona dibandingkan saat sebelum dan setelah diberikannya perlakuan dan juga dengan beberapa *time series*. Penyempitan zona bebas sel dihitung berdasarkan rumus (Nugrahenny,2012):

$$\% \text{ migrasi HUVECs} = 100 - ([x/y] \times 100) \%,$$

dengan x adalah lebar zona bebas sel setelah diberikan perlakuan dan y adalah lebar zona bebas sel saat sebelum diberikan perlakuan. Pengukuran zona tersebut dilakukan dengan penggaris pada komputer dari tepi atas hingga tepi bawah batas zona bebas sel. Migrasi sel endotel diamati dengan penyempitan jarak bebas sel dalam persen (%) dengan rentang waktu tertentu.



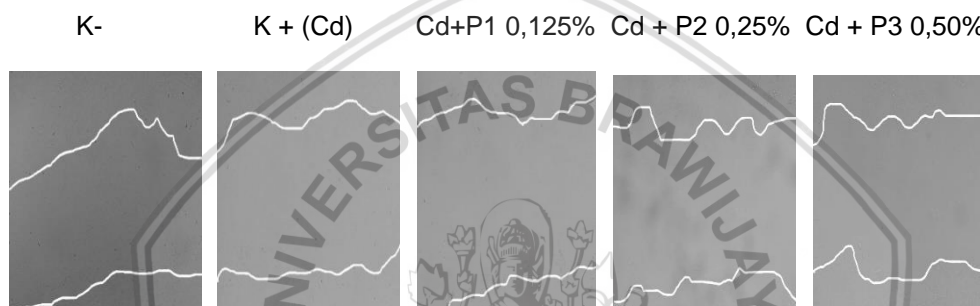
BAB 5

ANALISA DATA DAN HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil penelitian gambar zona bebas sel

Efek dari migrasi sel endotel yang di *scratch* dan dipapar cadmium setelah diberikan getah batang pisang Ambon dengan konsentrasi 0,5% pada jam ke 48



Gambar 5.1 migrasi sel endotel P3 (perlakuan 3) jam ke 48 dengan mikroskop inverted 400x

Gambar diatas merupakan gambar zona bebas sel endotel HUVECs. Jadi setelah dilakukan foto dengan mikroskop inverted perbesaran 400x dilakukan pengukuran zona dengan penggaris pada komputer dari tepi ke tepi zona bebas sel dalam (%) setelah rentang waktu tertentu. Penyempitan zona bebas sel dihitung berdasarkan rumus (Nugrahenny, 2012):

$$\% \text{migrasi HUVECs} = 100 - ((x/y) \times 100) \%$$

Dengan x adalah lebar zona bebas sel setelah diberi perlakuan sedangkan y adalah lebar zona bebas sel saat sebelum diberi perlakuan.

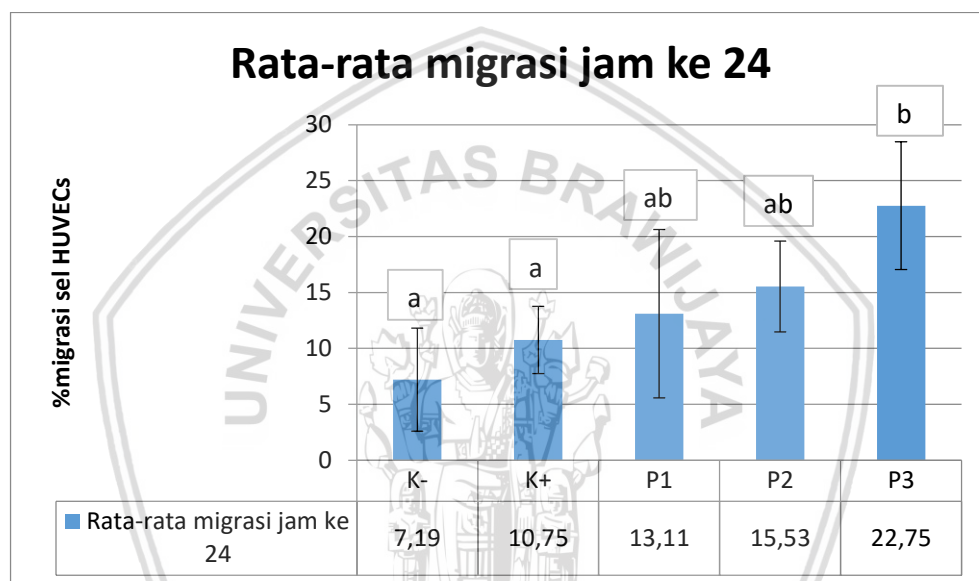
	Rerata(SD) % migrasi K-	Rerata(SD) % migrasi K+	Rerata(SD) % migrasi P1	Rerata(SD) % migrasi P2	Rerata(SD) % migrasi P3
Jam ke 12	6,76 (±3,83)	4,87(±5,98)	9,39(±4,47)	7,25(±5,46)	9,02(±7,28)
Jam ke 24	7,19(±4,61)	10,75(±3,02)	13,11(±7,53)	15,53(±4,06)	22,75(±5,71)
Jam ke 48	21,63(±5)	16,55(±11,33)	27,49(±7,22)	30,65(±5,51)	37,96(±1,2)

5.1 Tabel rata-rata %migrasi sel endotel HUVECs pada jam ke 12,24,48

5.1.2 Hasil migrasi sel endotel jam ke 12

Pada hasil penelitian migrasi sel HUVECs jam ke 12 didapatkan secara statistik uji ANOVA tidak signifikan sehingga untuk uji komparasi (uji pos hoc) tidak bisa dilakukan. Sehingga untuk data migrasi jam ke 12 pada penelitian ini tidak dicantumkan.

5.1.3 Hasil migrasi sel endotel jam ke 24

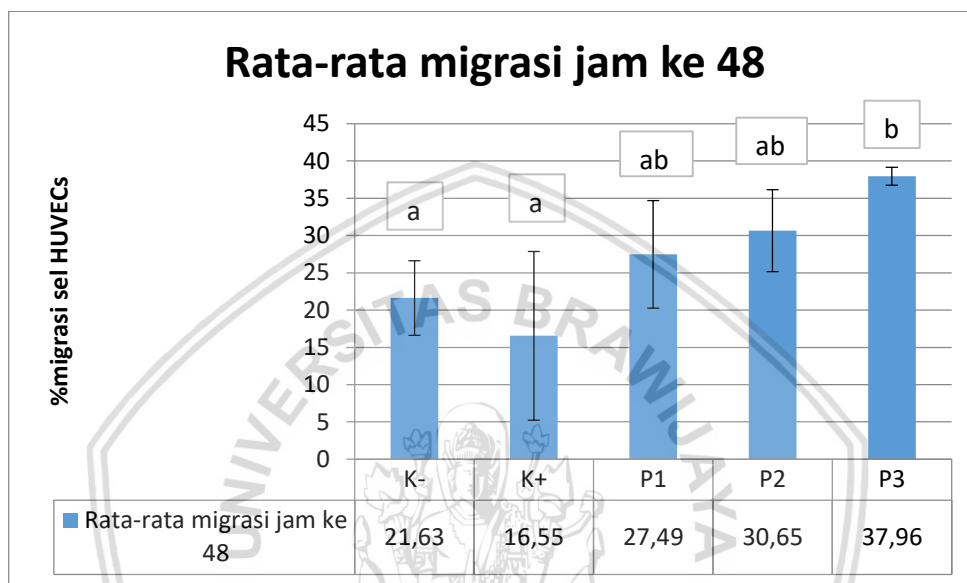


Gambar 5.2 grafik migrasi sel endotel jam ke 24

Diatas merupakan grafik migrasi sel endotel HUVECs jam ke 24. Berdasarkan grafik diatas K+ tidak berbeda bermakna dengan K- , kemudian ada peningkatan dari K+ ke P1 dan P2 namun secara statistik peningkatan tersebut tidak bermakna, kemudian pada K+ ke P3 terdapat peningkatan yang berbeda bermakna secara statistik. Jadi pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan bermakna pada perlakuan 3 (P3) yaitu dengan rata-rata %migrasi 22,75%. Perubahan signifikan pada penelitian ini yaitu perubahan migrasi sel endotel HUVECs yang menunjukkan bahwa terjadi penyembuhan luka akibat *scratch* dan logam berat *cadmium* yang diberikan, sehingga penyembuhan luka yang diberikan P3 lebih baik diantara semua perlakuan pada jam ke 24. Pada P1

dan P2 %migrasinya sama-sama lebih tinggi dibanding dengan K+ tapi setelah uji komparasi statistik ternyata tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif (K+). Demikian juga dengan K- ke K+ tidak berbeda bermakna.

5.1.4 Hasil migrasisel endotel jam ke 48



Gambar 5.3 grafik migrasi sel endotel jam ke 48

Diatas merupakan grafik migrasi sel endotel HUVECs jam ke 48. Berdasarkan grafik diatas K+ tidak berbeda bermakna dengan K- , kemudian ada peningkatan dari K+ ke P1 dan P2 namun secara statistik peningkatan tersebut tidak bermakna, kemudian pada K+ ke P3 terdapat peningkatan yang berbeda bermakna secara statistik. Jadi pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan bermakna pada perlakuan 3 (P3) yaitu dengan rata-rata %migrasi 37,96%. Perubahan signifikan pada penelitian ini yaitu perubahan migrasi sel endotel HUVECs yang menunjukkan bahwa terjadi penyembuhan luka akibat *scratch* dan logam berat *cadmium* yang diberikan, sehingga penyembuhan luka yang diberikan P3 lebih baik diantara semua perlakuan (P1 dan P2) pada jam ke 48. Pada P1 dan P2 %migrasinya sama-sama lebih tinggi dibanding dengan K+

tapi setelah uji komparasi statistik ternyata tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif (K+). Demikian juga dengan K- ke K+ tidak berbeda bermakna.

5.2 Analisis Data

5.2.1 Pengujian Perbedaan Migrasi Sel HUVECs Jam ke 12

5.2.1.1 Pengujian Normalitas Data Migrasi Sel HUVEC Jam ke 12

Pengujian normalitas data untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis memiliki distribusi normal atau tidak. Data dinyatakan terdistribusi normal jika nilai signifikansi (p value) $> 0,05$. Hasil pengujian normalitas data migrasi sel HUVECs Shapiro-Wilk jam ke 12 nilai signifikansinya 0,914. Hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal.

5.2.1.2 Pengujian homogenitas data migrasi sel HUVEC jam ke 12

Pengujian homogenitas data dilakukan karena data yang akan dibandingkan lebih dari satu kelompok. Uji homogenitas ini bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat homogen atau variasi pada tiap kelompok sama. Pengujian homogenitas data yang digunakan adalah Levene test. Nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan varian data yang tidak homogen, sedangkan nilai signifikansi $> 0,05$ menunjukkan varian data yang homogen. Hasil pengujian homogenitas data migrasi sel HUVECs jam ke 12 didapatkan p -value 0,668 yaitu diatas 0,05. Hal ini menunjukkan varian dari kelompok penelitian adalah homogen. Dengan hasil data yang normal dan homogen maka syarat one-way ANOVA terpenuhi.

5.2.1.3 Pengujian Analisis Varian (ANOVA) atau Uji Beda Data Migrasi Sel HUVECs Jam ke 12

Syarat untuk menggunakan uji one-way ANOVA yaitu data harus terdistribusi normal (p -value $> 0,05$) dan varansi data homogen (p -value $> 0,05$).

Pengujian analisis varian (ANOVA) merupakan uji untuk menganalisis variabilitas atau keragaman data menjadi 2 sumber variasi yaitu variasi dalam kelompok dan variasi antar kelompok. Uji ini untuk menguji komparatif rata-rata sampel. Uji analisis ANOVA signifikan jika nilai signifikansi (p -value) $< 0,05$. Hasil pengujian one-way ANOVA data migrasi sel HUVECs jam ke 12 signifikansinya adalah 0,780 yaitu diatas 0,05 berarti tidak signifikan. Karena hasil one-way ANOVA tidak signifikan yang berarti komparatif data tidak signifikan, maka uji lanjut (Post Hoc Test) tidak perlu dilanjutkan.

5.2.2 Pengujian Perbedaan Migrasi Sel HUVECs Jam ke 24

5.2.2.1 Pengujian Normalitas Data Migrasi Sel HUVEC Jam ke 24

Pengujian normalitas data untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis memiliki distribusi normal atau tidak. Data dinyatakan terdistribusi normal jika nilai signifikansi (p value) $> 0,05$. Hasil pengujian normalitas data migrasi sel HUVECs Shapiro-Wilk jam ke 24 nilai signifikansi 0,523 yaitu diatas 0,05 , hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal.

5.2.2.2 Pengujian Homogenitas Data Migrasi sel HUVEC jam ke 24

Pengujian homogenitas data dilakukan karena data yang akan dibandingkan lebih dari satu kelompok. Uji homogenitas ini bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat homogen atau variasi pada tiap kelompok sama. Pengujian homogenitas data yang digunakan adalah Levene test. Nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan varian data yang tidak homogen, sedangkan nilai signifikansi $> 0,05$ menunjukkan varian data yang homogen. Hasil pengujian homogenitas data migrasi sel HUVECs jam ke 24 didapatkan p -value 0,491 yaitu diatas 0,05. Hal ini

menunjukkan varian dari kelompok penelitian adalah homogen. Dengan hasil data yang normal dan homogen maka syarat one-way ANOVA terpenuhi.

5.2.2.3 Pengujian Analisis Varian (ANOVA) atau Uji Beda Data Migrasi Sel HUVEC Jam ke 24

Syarat untuk menggunakan uji one-way ANOVA yaitu data harus terdistribusi normal ($p\text{-value} > 0,05$) dan variansi data homogen ($p\text{-value} > 0,05$). Pengujian analisis varian (ANOVA) merupakan uji untuk menganalisis variabilitas atau keragaman data menjadi 2 sumber variasi yaitu variasi dalam kelompok dan variasi antar kelompok. Uji ini untuk menguji komparatif rata-rata sampel. Uji analisis ANOVA signifikan jika nilai signifikansi ($p\text{-value}$) $< 0,05$. Hasil pengujian one-way ANOVA data migrasi sel HUVECs jam ke 24 nilai signifikansinya adalah 0,009 yaitu dibawah 0,05 berarti memiliki perbedaan yang berpengaruh signifikan antara perlakuan yang satu dengan perlakuan lainnya sehingga perlu dilakukan pengujian perbandingan berganda (uji lanjut).

5.2.2.4 Uji Lanjut Data Migrasi Sel HUVEC Jam ke 24 (Post Hoc Test)

Uji *Post Hoc Test* merupakan uji pembandingan ganda (*Multiple Comparison Test*). Uji ini bertujuan untuk menunjukkan pasangan kelompok konsentrasi yang memberikan perbedaan signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan signifikan. Uji lanjut *Post Hoc* Tukey HSD dan LSD ini digunakan untuk pengujian perbandingan berbagai kelompok rata-rata. Pada hasil uji lanjut (*Post Hoc Test*) jam ke 24 didapatkan bahwa terjadi perbedaan yang signifikan yaitu dengan $p\text{-value}$ ($p < 0,05$) pada K- (kontrol negatif) dengan P3 (perlakuan 3) dan K+ (kontrol positif) dengan P3 (perlakuan 3).

5.2.3 Pengujian Perbedaan Migrasi Sel HUVECs Jam ke 48

5.2.3.1 Pengujian Normalitas Data Migrasi Sel HUVEC Jam ke 48

Pengujian normalitas data untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis memiliki distribusi normal atau tidak. Data dinyatakan terdistribusi normal jika nilai signifikansi (p value) $> 0,05$. Hasil pengujian normalitas data migrasi sel HUVECs Shapiro-Wilk nilai signifikansinya 0,236 yaitu diatas 0,05 ,hal ini menunjukkan data terdistribusi dengan normal.

5.2.3.2 Pengujian homogenitas data migrasi sel HUVEC jam ke 48

Pengujian homogenitas data dilakukan karena data yang akan dibandingkan lebih dari satu kelompok. Uji homogenitas ini bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat homogen atau variasi pada tiap kelompok sama. Pengujian homogenitas data yang digunakan adalah Levene test. Nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan varian data yang tidak homogen, sedangkan nilai signifikansi $> 0,05$ menunjukkan varian data yang homogen. Hasil pengujian homogenitas data migrasi sel HUVECs jam ke 48 didapatkan p -value 0,053 yaitu diatas 0,05. Hal ini menunjukkan varian dari kelompok penelitian adalah homogen. Dengan hasil data yang normal dan homogen maka syarat one-way ANOVA terpenuhi.

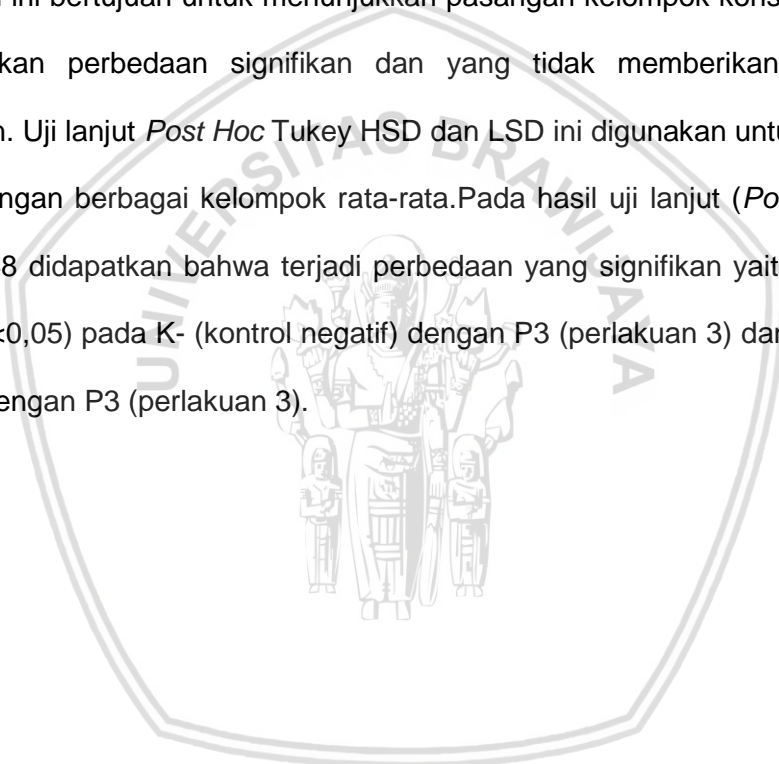
5.2.3.3 Pengujian Analisis Varian (ANOVA) atau Uji Beda Data Migrasi Sel HUVEC Jam ke 48

Syarat untuk menggunakan uji one-way ANOVA yaitu data harus terdistribusi normal (p -value $>0,05$) dan varansi data homogen (p -value $>0,05$). Pengujian analisis varian (ANOVA) merupakan uji untuk menganalisis variabilitas atau keragaman data menjadi 2 sumber variasi yaitu variasi dalam kelompok dan variasi antar kelompok. Uji ini untuk menguji komparatif rata-rata sampel. Uji analisis ANOVA signifikan jika nilai signifikansi (p -value) $< 0,05$. Hasil pengujian

one-way ANOVA data migrasi sel HUVECs jam ke 48 nilai signifikansinya adalah 0,005 yaitu dibawah 0,05 berarti memiliki perbedaan yang berpengaruh signifikan antara perlakuan yang satu dengan perlakuan lainnya sehingga perlu dilakukan pengujian perbandingan berganda (uji lanjut).

5.2.3.4 Uji Lanjut Data Migrasi Sel HUVEC Jam ke 48 (Post Hoc Test)

Uji *Post Hoc Test* merupakan uji pembandingan ganda (*Multiple Comparison Test*). Uji ini bertujuan untuk menunjukkan pasangan kelompok konsentrasi yang memberikan perbedaan signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan signifikan. Uji lanjut *Post Hoc* Tukey HSD dan LSD ini digunakan untuk pengujian perbandingan berbagai kelompok rata-rata. Pada hasil uji lanjut (*Post Hoc Test*) jam ke 48 didapatkan bahwa terjadi perbedaan yang signifikan yaitu dengan p-value ($p < 0,05$) pada K- (kontrol negatif) dengan P3 (perlakuan 3) dan K+ (kontrol positif) dengan P3 (perlakuan 3).



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini telah dilakukan penelitian untuk membuktikan efek getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*) yang mengandung kandungan bahan aktif seperti saponin, flavonoid dan tanin terhadap peningkatan migrasi sel endotel melalui uji invitro menggunakan HUVECs yang dipapar oleh *cadmium* dan dianalisa menggunakan mikroskop inverted perbesaran 400x. Pada penelitian ini terdapat 5 sampel penelitian dengan masing-masing sampel terdiri dari 4x pengulangan. Penelitian ini diamati dalam 3 *time series* yaitu jam ke 12, 24, dan 48. Kontrol (-) adalah kontrol yang hanya di *scratch* yang merupakan penanda terjadinya inflamasi secara mekanis, sedangkan K (+) adalah kontrol yang selain di *scratch* juga di berikan inflamasi secara kimia dengan logam berat *cadmium*. Perlakuan 1 (P1) merupakan kelompok dengan *scratch*, *cadmium*, dan perlakuan getah batang pisang Ambon prosentase 0,125%. Perlakuan 2 (P2) merupakan kelompok dengan *scratch*, *cadmium* dan perlakuan getah batang pisang Ambon prosentase 0,25%. Dan perlakuan 3 (P3) merupakan kelompok dengan *scratch*, *cadmium*, dan perlakuan getah batang pisang Ambon prosentase 0,5%.

Kultur sel HUVECs dipilih karena dapat mempelajari struktur dan fungsi dari sel endotel terhadap stimulus eksogen (Liu et al.,2011). *Cadmium* dapat meningkatkan inflamasi sel, dengan dipapar oleh *cadmium* migrasi sel endotel akan menurun. Pada hasil penelitian K+ (kelompok dengan *cadmium*) pada jam ke 12 menunjukkan penurunan migrasi sel endotel dibanding pada K- (kelompok

tanpa *cadmium*) yang sebelumnya 6,76% menjadi 4,87%. Hal tersebut menunjukkan adanya kecenderungan penurunan yang terjadi pada jam ke 12, namun secara statistik tidak signifikan. Penurunan migrasi sel endotel tersebut terjadi karena *cadmium* dapat berikatan dengan membran protein di mitokondria yang menyebabkan transisi permeabilitas mitokondria dan menghambat rantai reaksi respirasi sehingga akan membentuk ROS (*Reactive Oxygen Species*). Mekanisme toksisitas akut *cadmium* yaitu adanya deplesi glutathione dan adanya ikatan protein dengan sulfhydryl yang akhirnya akan memproduksi ROS seperti ion superoksida, hydrogen peroksida, dan radikal hydroxyl. *Cadmium* juga akan meningkatkan ROS dengan produksi lipid peroksidasi dan menyebabkan kerusakan DNA (Liu et al, 2009).

Pada jam ke 24, K+ (kontrol dengan *cadmium*) jam ke 24 mengalami peningkatan migrasi sel endotel dibandingkan dengan K- (kontrol tanpa *cadmium*) tetapi pada jam ke 48 mengalami penurunan kembali migrasi sel endotel. Secara statistik tren jam ke 24 dan jam ke 48 tersebut juga sama-sama tidak signifikan. Pada jam ke 24 mengalami peningkatan karena sel endotel akan memulai proses *primary wound healing* dan akan terjadi proses proliferasi sel endotel. Sedangkan pada jam ke 48 akan terjadi penurunan kembali karena terjadinya fase *remodelling* (penyembuhan) yang mana proliferasi sel akan berhenti sebagai akibat sudah terjadinya proliferasi sel di 24 jam pertama.

Pada penelitian ini hasil penelitian juga menunjukkan bahwa pemberian getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*) memberikan peningkatan migrasi sel endotel pada HUVECs yang dipapar *cadmium* dengan hasil signifikan berbeda pada perlakuan 3 (dosis dengan konsentrasi 0,5%) pada jam ke 24 dan jam ke 48. Sedangkan pada kelompok kontrol positif (K+) terdapat

peningkatan pada kelompok perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2) namun tidak bermakna secara statistik. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh jumlah sampel yang terlalu sedikit (n sedikit) sehingga standar deviasi (SD) yang terlalu tinggi antar kelompok sampel penelitian.

Pada penelitian jam ke 24 dan jam ke 48 didapatkan perbedaan % migrasi yang signifikan pada perlakuan kontrol positif (K+) ke perlakuan 3 (P3). Hal tersebut berarti terdapat migrasi yang signifikan bermakna pada sel HUVEC yang diberikan getah batang pisang Ambon. Pada penelitian ini terdapat peningkatan penutupan bebas zona yang signifikan pada prosentase dosis 0,5% pada jam ke 24 dan jam ke 48.

Liu et al mengatakan bahwa terdapat mekanisme adaptif pada paparan *cadmium* kronik dosis rendah yang menyebabkan ROS yang rendah dan toleransi apoptosis, yang akan menyebabkan proliferasi sel yang rusak dengan ekspresi gen yang berbeda dengan sel lainnya. Sedangkan pada *cadmium* dosis tinggi dapat menyebabkan produksi peningkatan *stress oxidative* pada epitel paru tikus yang berhubungan dengan apoptosis kematian lebih dari setengah sel (Templeton et al, 2010).

Paparan $1\mu\text{M}$ *cadmium* selama 28 minggu tidak meningkatkan level ROS, tapi memberikan peningkatan sel untuk produksi *aggressive tumours* ketika diinjeksikan pada tikus. Seperti halnya, *cadmium* kronik $1\mu\text{M}$ dapat mengubah sel urothelial manusia dan menyebabkan resistensi pada kerusakan DNA, yang mana pada konsentrasi tinggi akan membunuh sel. Adanya oksidatif kerusakan DNA penting untuk *cadmium* dalam menginduksi progresivitas menjadi neoplasia (Templeton et al, 2010).

Cadmium dapat mendepleksi glutathione (GSH) dan mengganggu keseimbangan sulfhydryl yang memicu *stress oxidative* dan peroksidasi lipid. Pada penelitian *invivo* dan *invitro* menunjukkan bahwa *cadmium* menghambat proliferasi sel endotel dan kematian sel dan angiogenesis (Lee et al, 2011)

Getah batang pisang Ambon memiliki senyawa aktif dalam mekanisme penyembuhan luka. Beberapa kandungan yang terdapat dalam getah batang pisang Ambon yaitu saponin, flavonoid, dan tanin. Saponin dapat menstimulasi proliferasi sel dengan adanya *extracellular growth factor* bFGF serta menstimulasi sel HUVECs dengan *tube formation* (Morisaki et al, 1995). Flavonoid adalah antioksidan potensial yang larut dalam air yang mencegah kerusakan sel dan mencegah aktivitas antikanker. Flavonoid juga memberikan aktivitas antiinflamasi (Harisaranraj et al., 2009; Hasanoglu et al., 2001). Tanin juga dapat memicu penyembuhan luka dengan mekanisme seluler yaitu membuang radikal bebas dan memicu pertumbuhan fibroblast serta pembuluh darah (Lai et al., 2011). Beberapa senyawa fitokimia yang terkandung dalam getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca*) yaitu *alkaloids*, *steroids like β -sitisterol*, *saponin*, *flavonoid like quercetin*, *reducing sugar*, *tanin* dan *antraquinone* (Lavanya et al, 2016).

Pada penelitian lainnya terdapat aktivitas penyembuhan luka dan kapasitas antioksidan dari ekstrak getah *M.paradisiaca*. Kelompok dengan ekstrak methanolic dan hexanoic *M.paradisiaca* menunjukkan penyembuhan luka yang baik dibanding kelompok ekstrak kloroform dengan penghambatan 80-90%. Hal tersebut juga karena adanya *alkaloids*, *tanin*, *saponin*, dan *phenols* sebagai substansi kapasitas antioksidan. Ekstrak methanolic dan hexanoic *M.paradisiaca* menunjukkan penyembuhan luka pada tikus wistar, hal tersebut karena adanya

peran utama substansi antioksidan yang berkontribusi dalam akselerasi atau percepatan proses penyembuhan luka (Camberos et al, 2016)

Sedangkan pada penelitian yang lain juga getah batang pisang Ambon mempercepat proses penyembuhan luka pada ekstraksi gigi tikus dengan adanya peningkatan ekspresi PDGF-BB dengan proliferasi fibroblast. Fibroblast tersebut yang akan membentuk jaringan granulasi yang bertanggung jawab pada *extracellular matrix* selama proses penyembuhan luka. Kandungan getah pisang seperti lektin berperan dalam adhesi sel endotel yang rusak sebagai hasil untuk *tooth revocation* yang mengaktifkan GP1B yang merupakan glikoprotein untuk pembekuan darah (Budi et al, 2016)

Dari hasil penelitian ini menunjukkan getah pisang Ambon dapat menstimulasi proses penyembuhan luka dengan migrasi sel endotel. Dengan banyaknya kandungan senyawa aktif dalam getah batang pisang ambon seperti saponin yang menstimulasi proliferasi sel, flavonoid sebagai antioksidan yang mencegah kerusakan sel serta tanin yang membuang radikal bebas. Hal tersebut menyebabkan meningkatnya migrasi sel endotel HUVECs.

Dengan demikian pada hipotesa yang menyatakan bahwa getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*) dapat meningkatkan migrasi sel endotel pada HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang dipapar *cadmium* terbukti.

6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh terdapat beberapa implikasi yang dapat digunakan dalam bidang kedokteran yaitu:

1. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi bagi peneliti lain yang melakukan penelitian yang sama sehingga dapat menambah informasi bagi peneliti lainnya
2. Penelitian ini diharapkan kedepannya untuk dapat dilakukan pengembangan dalam pembuatan ekstrak getah batang pisang dan zat aktif yang dominan memberikan peran dalam penyembuhan luka
3. Penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk pembuatan obat yang berasal dari getah batang pisang Ambon yang berguna membantu untuk proses penyembuhan luka kedepannya

6.3 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini memiliki keterbatasan yang mempengaruhi hasil penelitian ini yaitu:

1. Keterbatasan dalam melakukan kultur endotel sehingga menghasilkan sel kultur HUVECs yang baik
2. Keterbatasan dalam mengetahui kandungan aktif apa dan berapa banyak zat aktif yang terlibat dalam mempengaruhi proses *wound healing*.
3. Keterbatasan dalam mendapatkan getah batang pisang Ambon yang terstandarisasi

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan yang telah dilakukan maka dapat ditarik kesimpulan:

1. Terdapat pengaruh getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*) terhadap migrasi sel endotel pada HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) yang dipapar *cadmium* berpengaruh signifikan pada konsentrasi 0,5% pada jam ke 24 dan jam ke 48.
2. Tidak ditemukan perbedaan pengaruh migrasi sel HUVEC antara yang dipapar *cadmium* dengan yang tidak dipapar *cadmium* pada prosentase dosis 0,125% ; 0,25% ; 0,5% dengan 3 time series.

7.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian tentang kandungan aktif yang paling banyak dalam getah batang pisang Ambon (*Musa paradisiaca var.sapientum*) sehingga bisa diketahui kandungan aktif yang dominan bekerja dalam proses *wound healing* seperti kandungan flavonoid berapa persen serta kandungan bahan aktif lainnya.
2. Perlu dilakukan peningkatan atau penurunan dosis *cadmium* untuk mendapatkan dosis yang dapat membuat pemberian *cadmium* bermakna yang bisa membuat sel HUVECs berubah fungsi

3. Perlu dilakukan pemberian *cadmium* yang kronis yaitu dengan pemberian *cadmium* dalam kontak waktu yang lama serta perlu dilakukan pemeriksaan kadar *cadmium* di dalam kultur sel endotel
4. Penelitian dengan jumlah pengulangan sampel yang lebih banyak lagi untuk tidak adanya perbedaan data yang terlalu jauh sehingga dapat memperkecil standar deviasi yang ada.



DAFTAR PUSTAKA

- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P., & Brem, H. 2009. *The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. Journal of Surgical Research*, 153(2), 347-358.
- Bernhoft, R. A. 2013. *Cadmium toxicity and treatment. The Scientific World Journal*, 2013.
- Dani, F. R. 2012. *Potensi Ekstrak Umbi Teki (Cyperus Rotundus L.) Dalam Menurunkan Jumlah Limfosit Jaringan Granulasi Setelah Pencabutan Gigi Tikus Wistar Jantan*. Skripsi. Bagian Biomedik. Fakultas Kedokteran. Universitas Jember.
- Harisaranraj, R., Suresh, K., & Saravanababu, S. (2009). Evaluation of the Chemical Composition Rauwolfia serpentina and Ephedra vulgaris. *Advances in Biological Research*, 3(5-6), 174-178.
- Hasanoglu, A., Ara, C., Ozen, S., Kali, K., Senol, M., & Ertas, E. (2001). Efficacy of micronized flavonoid fraction in healing of clean and infected wounds. *International Journal of Angiology*, 10(1), 41-44.
- Imam, M. Z., & Akter, S. (2011). Musa paradisiaca L. and Musa sapientum L.: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(5), 14-20.
- Kanzaki, T., Morisaki, N., Shiina, R., & Saito, Y. 2009. *Role of transforming growth factor- β pathway in the mechanism of wound healing by saponin from Ginseng Radix rubra. British journal of pharmacology*, 125(2), 255-262.
- Kartika, R. W. 2015. Perawatan Luka Kronis dengan Modern Dressing. *Teknik*, 42(7), 546-50.

- Kumar, Vinay, Abbas, K. Abul & Aster Jon C., 2013. Robbins Basic Pathology. Singapura. Elsevier SAUNDERS
- Lai et al. *Potensi Dermal Wound Healing Agent in Blechnum Orientale Linn.* BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011; 11:62
- Lai, H. Y., Lim, Y. Y., & Kim, K. H. 2011. *Potential dermal wound healing agent in Blechnum orientale Linn.* BMC complementary and alternative medicine, 11(1), 62.
- Lamalice L, Le Boeuf F, Hout J. 2007. *Endothelial Cell Migration During Angogenesis.* Circulation Research. 100:782-794.
- Lavanya, K., Abi Beulah, G., & Vani, G. 2016. *Musa paradisiaca—a review on phytochemistry and pharmacology.* World Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research, 2(6), 163-173.
- Liu, H. T., Huang, P., Ma, P., Liu, Q. S., Yu, C., & Du, Y. G. 2011. *Chitosan oligosaccharides suppress LPS-induced IL-8 expression in human umbilical vein endothelial cells through blockade of p38 and Akt protein kinases.* Acta Pharmacologica Sinica, 32(4), 478.
- Morrow, H. 2010. "Cadmium and Cadmium Alloys". Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons. pp. 1–36. ISBN 978-0-471-23896-6. doi:10.1002/0471238961.0301041303011818.a01.pub3.
- Mudau, M., Genis, A., Lochner, A., & Strijdom, H. 2012. *Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis.* Cardiovascular journal of Africa, 23(4), 222.
- Newman, M. G., Takei, H. H., & Carranza, F. A. 2012. Carranza's *clinical periodontology*/[edited by] Michael G. Newman, Henry H. Takei, Perry R. Klokkevold; editor emeritus, Fermin A. Carranza.

- Noor. 2011. Macam Kultur Jaringan. Diakses melalui <http://id.shvoong.com/exact-sciences/bioengineering-and-biotechnology/2112308-macam-kultur-jaringan/#ixzzVTYHYeQz> pada 27 Desember 2013.
- Nugrahenny, D., Widodo, M. A., & Permatasari, N. 2013. *Vitamin E Mempertahankan Kemampuan EPC yang Dipapar Glukosa Tinggi dalam Pelepasan NO dan Induksi Migrasi Sel Endotel. Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(1), 8-15.
- Nurhidayat. 2010. *Kultur Sel Endotel (Huvecs) dan penggunaannya dalam penelitian*. Diakses melalui <http://lsihub.lecture.ub.ac.id/2010/03/04/kultur-sel-endotel-huvecs-dan-penggunaannya-dalam-penelitian/> pada 27 Desember 2013.
- Prasetyo, B. F. 2008. *Aktivitas dan uji stabilitas sediaan gel ekstrak batang pisang ambon (Musa paradisiaca var sapientum) dalam proses persembuhan luka pada mencit (mus musculus albinus)*. IPB Bogor.
- Robbins. 2004. *Buku Ajar Patologi Robbins Edisi 7 Volume 1*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Sargowo, D. 2003. *Disfungsi endotel pada penyakit kardiovaskuler*. Malang: Bayumedia Publishing. Hal 1-14
- Shailendra S, Alistair Y, Clare-Ellen McNaught. 2017. *Basic science the physiology of wound healing*. Surgery 36:9
- Subhadip Kundu, Suman Sengupta, Soumya Chatterjee, Soham Mitra and Arindam Bhattacharyya. 2009. *Cadmium induce lung inflammation independent of lung cell proliferation : a mollecular approach*. June 2009 doi:10.1186/1476-9255-6-19

- Tortora, Gerard J., and Bryan Derrickson. 2011. *Principles of anatomy and physiology*. Hoboken, N.J.:Wiley.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. 2009. *The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms*. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., & Beyersmann, D. 2003. *Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis*. *Toxicology*, 192(2-3), 95-117.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. 2004. *Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response*. *Trends in plant science*, 9(5), 244-252.
- Wijaya, A. R. 2010. *Getah Pisang sebagai Obat Alternatif Tradisional Penyembuh Luka Luar Menjadi Peluang sebagai Produk Industri*. *Skripsi Universitas Islam Indonesia*.
- William. 2003. *Angiogenesis in Wound Healing*. *Contemporary Surgery*. A supplement to contemporary surgery.
- Yosaphat, 2012. *Getah Pisang untuk Benang Operasi*. Kompas Surabaya. (online)<http://sainskompas.com/read/2012/07/04/04362131/Getah.Pisang.untuk.Benang.Operasi>